

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEOMARA FLORIANO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* EM BAGAÇOS DE UVAS (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

CURITIBA

2016

LEOMARA FLORIANO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* EM BAGAÇOS DE UVAS (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, em Engenharia de Alimentos, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani.

CURITIBA

2016

R484a

Ribeiro, Leomara Floriano

Avaliação dos compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* em bagaços de uvas (*vitis vinífera* e *vitis labrusca*). / Leomara Floriano Ribeiro. – Curitiba, 2016.

123f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk.-- Coorientadora: Rosemary Hoffmann Ribani.


1. Antocianinas. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes. 4. Uva. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III. Ribani, Rosemary Hoffmann. IV. Título.

CDD: 660.6

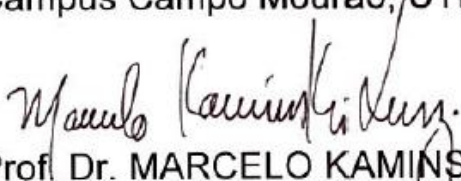
LEOMARA FLORIANO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
IN VITRO E IN VIVO DE BAGAÇOS DE UVAS (*Vitis vinifera* E *Vitis
labrusca*)**

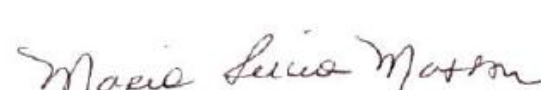
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da
Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos
professores:

Orientador:  Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Campus Curitiba, UTFPR


Prof. Dr. BOGDAN DEMCZUK JUNIOR
Campus Campo Mourão, UTFPR


Prof. Dr. MARCELO KAMINSKI LENZI
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a. Dr^a. MICHELE RIGON SPIER
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a. Dr^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 12 de maio de 2016.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus por ter me concedido tantas graças ao longo desta trajetória e à minha família pelo apoio, amor incondicional e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita misericórdia ao iluminar todos os dias o meu caminho.

Aos meus pais, Leonildo e Maria, meus irmãos Rodrigo e Lucas, que sempre me apoiaram em todos os momentos e, principalmente, me deram força e coragem nos momentos de dificuldades. A todos os meus familiares que direta ou indiretamente me auxiliaram ao longo deste período.

Ao Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, por ter me concedido a oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pela confiança em mim depositada e pela compreensão ao longo destes quatro anos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani pela orientação e por ter estado à disposição para esclarecer as minhas dúvidas e me auxiliar nos diversos momentos.

À Profa. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz e à Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani pelas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação I.

À Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe por ter aceitado ser membro da banca de pré-defesa.

Ao Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior, ao Prof. Dr. Marcelo Kaminski Lenzi, à Profa. Dra. Maria Lúcia Masson e à Profa. Dra. Michele Rigon Spier por terem aceitado ser membros da banca de defesa.

Aos demais professores que colaboraram na minha formação e contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

À Dra. Andréia Assunção Soares pela realização dos ensaios de capacidade antioxidante *in vivo*. À Profa. Dra. Rosane M. Peralta e ao Prof. Dr. Adelar Bracht pela parceria e por disponibilizar os laboratórios na Universidade Estadual de Maringá para realização dos ensaios *in vivo*.

À Dra. Thaís M. Guimarães de Francisco e ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela parceria na realização das análises de identificação de antocianinas em Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas.

As empresas Franco Italiano (Colombo/PR), Durigan (Curitiba/PR), COAVITI (Marialva/PR) e Família Ceccon (Colombo/PR) que gentilmente doaram as amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Eriel Forville de Andrade por sempre me auxiliar com seus conhecimentos técnicos e nas análises em Cromatografia Gasosa e Líquida.

As técnicas de laboratório Patrícia, Andréia e Sheila pela amizade, disponibilidade, cooperação e paciência no decorrer desse trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – UFPR, Paulo Krainski pelos serviços prestados.

As minhas amigas Luana e Paloma por toda a amizade, compreensão e auxílio nos mais variados momentos. Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, em especial a Helayne, Aline, Adriano, Rafael, Gerson, Larize e Fabiane pelos momentos de amizade e descontração.

Aos novos amigos da UFPR - Campus Avançado em Jandaia do Sul que durante os últimos meses tem me dado apoio, força e ânimo para o término do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito Obrigada!

*"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida;
duvidando começamos a questionar,
e procurando podemos achar a verdade."*

Pierre Abelard

RESUMO GERAL

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo. Destina-se tanto para o consumo *in natura*, como também para a produção de sucos e vinhos. A partir do processo de vinificação é gerada uma quantidade expressiva de resíduos, principalmente, o bagaço de uva, composto por sementes, cascas e engaço. O bagaço de uva contém diferentes compostos bioativos, como os compostos de natureza flavonoide e compostos de natureza não flavonoide, os quais permanecem no resíduo devido a sua extração incompleta durante o processamento. Os compostos bioativos podem apresentar atividades biológicas, tais como atividade antioxidante. Desta forma, é interessante determinar o teor de compostos bioativos bem como a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar a possibilidade de reaproveitamento do mesmo. No presente estudo, as variedades avaliadas foram Cabernet Sauvignon (CS) e Merlot (ME) (*Vitis vinifera* L.), Terci (TE) e Mix (MI) (*Vitis labrusca* L.), sendo este último composto pelas variedades Bordô, Isabel e BRS Violeta, cada uma nas proporções 65%, 25% e 10%, respectivamente. Todas as amostras foram submetidas à análise de composição centesimal, em seguida os compostos bioativos foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais e antocianinas monoméricas totais por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis). A variedade MI apresentou a maior quantidade de CFT ($4124,46 \pm 115,01$ mg em equivalentes de ácido gálico 100 g^{-1}) e de flavonoides totais ($2157 \pm 10,11$ mg em equivalentes de catequina 100 g^{-1}) e quando comparada com as demais variedades apresentou-se estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$). As antocianinas totais foram quantificadas pelo método de pH diferencial em espectrofotômetro UV-Vis a 510 e 700 nm e as antocianinas individuais foram identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (CLAE-EM). A variedade TE apresentou a maior quantidade de antocianinas totais por UV-Vis ($414,95 \pm 3,37$ mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1}) e por CLAE ($409,71 \pm 17,13$ mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1}) estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) das demais variedades. Em todas as amostras foram identificadas 13 diferentes antocianinas. Entre os compostos bioativos determinados nas variedades de bagaço de uva analisadas por CLAE estão os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *trans*-cinâmico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico), flavan-3-óis (catequina), flavonóis (quercetina, rutina e caempferol), estilbeno (resveratrol), e por cromatografia gasosa (CG) os ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico e ácido α -linolênico). Com relação à determinação da atividade antioxidante, os ensaios *in vitro* mostraram que o bagaço de uva da variedade ME apresentou elevada capacidade antioxidante com base nos métodos DPPH ($2,58 \pm 0,07$ mg mL^{-1}) e auto-oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico ($70,60 \pm 0,91\%$). Nos testes iniciais dos ensaios biológicos, a capacidade antioxidante foi determinada com relação à geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) nas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Holtzman, sendo que os resultados mostraram que houve inibição significativa na geração de EROs. Posteriormente, avaliou-se o homogenato dos tecidos fígado e cérebro e da peroxidação lipídica nos ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). Os dados obtidos mostraram que houve uma tendência em restabelecer os níveis avaliados de estresse oxidativo em relação ao grupo controle, indicando o efeito antioxidante do extrato de ME sobre os ratos com artrite induzida. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que os bagaços de uva apresentaram em sua composição não somente compostos bioativos, mas também potencial antioxidante, e que podem ser reaproveitados pela indústria de alimentos e farmacêutica porque podem ser fonte alternativa para alimentos funcionais, suplementos ou formulação de nutraceuticos.

Palavras-chave: compostos fenólicos totais. Antocianinas. Perfil de ácidos graxos. Capacidade antioxidante. Artrite induzida por adjuvante.

GENERAL ABSTRACT

The grape is one of the most cultivated fruit in the world. It is intended both for fresh consumption, but also for the production of juices and wines. From the winemaking process a significant amount of waste is generated mainly grape pomace, consisting of seeds, skins and stems. The grape pomace contains different bioactive compounds, such as compounds of flavonoid in nature and compounds of a non flavonoid, which remain in the residue due their incomplete extraction during processing. The bioactive compounds may have biological activities such as antioxidant activity. Thus, it is interesting to determine the content of bioactive compounds as well as antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* to evaluate the possibility of reusing. In this study, the varieties were evaluated Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME) (*Vitis vinifera*), Terci (TE) and Mix (MI) (*Vitis labrusca*), with the latter being composed by the varieties Bordeaux, Isabel and BRS Violet, each in the proportions 65%, 25% and 10%, respectively. All samples were submitted to analysis of chemical composition, then the bioactive compounds were evaluated for the phenolic compounds total content (PCT), total flavonoids content and total monomeric anthocyanins by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis). The variety ME had the highest amount of CFT (4124.46 ± 115.01 mg of gallic acid equivalents 100 g^{-1}) and total flavonoids (2157 ± 10.11 mg catechin equivalents 100 g^{-1}) and when compared to other varieties was statistically different ($p \leq 0.05$). The anthocyanins were quantified by the pH differential method in UV-Vis spectrophotometer at 510 and 700 nm and individual anthocyanins have been identified by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS). The variety TE showed the highest amount of anthocyanins by UV-Vis (414.95 ± 3.37 mg equivalent of cyanidin-3-glucoside 100 g^{-1}) and HPLC (409.71 ± 17.13 mg equivalent of cyanidin 3-glucoside 100 g^{-1}) statistically different ($p \leq 0.05$) from other varieties. All samples were identified 13 different anthocyanins, with more intense signals for malvidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-acetylglucoside and malvidin-3-O-p-coumaroylglucoside. Among the bioactive compounds in certain grape pomace varieties analyzed for HPLC are phenolic acids (gallic acid, vanillic acid, syringic acid, *trans*-cinnamic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid), flavan-3-ols (catechins), flavonols (quercetin, rutin and kaempferol), stilbene (resveratrol) and polyunsaturated fatty acids (linoleic and α -linolenic acid) by gas chromatography (GC). With respect to the antioxidant activity, *in vitro* assays showed that the grape pomace of the variety ME showed high antioxidant capacity based on the methods DPPH (2.58 ± 0.07 mg mL^{-1}) and auto-oxidation system β -carotene/linoleic acid ($70.60 \pm 0.91\%$). In initial tests of biological assays, the antioxidant capacity was determined with respect to the generation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria isolated from rat liver Holtzman, and the results showed significant inhibition in the generation of ROS. Then it was performed the evaluation of the liver tissue homogenate and brain and lipid peroxidation in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). The data showed that there was a tendency to restore the assessed levels of oxidative stress compared to the control group, indicating the antioxidant effect of ME extract on rats with induced arthritis. From the results obtained it is concluded that grape pomace had in their composition not only bioactive compounds but also antioxidant potential, and which can be reused by the food and pharmaceutical industries because they may be an alternative source for functional foods, supplements or nutraceuticals formulation.

Keywords: Phenolic compounds. Anthocyanins. Fatty acid profile. Capacity antioxidant. Adjuvant induced arthritis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.1 –	REGIÕES BRASILEIRAS DE CULTIVO DE UVAS FINAS E UVAS DE MESA.....	20
FIGURA 1.2 –	PRODUÇÃO MUNDIAL DE UVAS FINAS E UVAS DE MESA, SAFRA 2013/2014.....	21
FIGURA 1.3 –	FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINHO TINTO.....	23
FIGURA 1.4 –	PRINCIPAIS COMPOSTOS FENOLICOS ENCONTRADOS NAS CASCAS E SEMENTES DA UVA.....	24
FIGURA 1.5 –	ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	29
FIGURA 1.6 –	ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES.....	30
FIGURA 1.7 –	ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTOCIANIDINAS: A) ESTRUTURA BÁSICA COM O CÁTION FLAVILIM E B) PRINCIPAIS ANTOCIANIDINAS.....	31
FIGURA 1.8 –	ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS DEPENDO DO PH E REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS. ONDE $R_1 = H$ OU SACARÍDEO, R_2 E $R_3 = H$ OU METIL.....	32
FIGURA 1.9 –	ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (A) E HIDROXICINÂMICOS (B).....	33

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1 –	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCI (TE).....	52
FIGURA 2.2 –	TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCI (TE).....	53
FIGURA 2.3 –	TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCI (TE).....	54

CAPÍTULO 3

FIGURA 3.1 –	CROMATOGRAMA DO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE MIX (<i>Vitis labrusca</i>) MONITORADO A 280 NM (A), 320 NM (B) e 370 NM (C) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD) EM RELAÇÃO AOS ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES.....	65
FIGURA 3.2 –	CROMATOGRAMA DO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM/EM).....	70
FIGURA 3.3 –	ESPECTRO DE MASSAS DE QUATRO ANTOCIANINAS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON (CS).....	73
FIGURA 3.4 –	ESPECTRO DE MASSAS DE NOVE ANTOCIANINAS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON (CS).....	74
FIGURA 3.5 –	TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE).....	75
FIGURA 3.6 –	CROMATOGRAMA DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE MERLOT OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC).....	77

CAPÍTULO 4

FIGURA 4.1 –	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE).....	94
FIGURA 4.2 –	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE).....	96
FIGURA 4.3 –	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO PELO MÉTODO DA AUTO-OXIDAÇÃO DO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE).....	97
FIGURA 4.4 –	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE).....	98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1.1 – PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM DIFERENTES FRAÇÕES DA UVA.....	26
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 2.1 – CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE UVA COM RELAÇÃO À VARIEDADE, PROCEDENCIA E PERÍODO DE OBTENÇÃO.....	43
TABELA 2.2 – COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (<i>Vitis vinífera</i> E <i>Vitis labrusca</i>).....	49

CAPÍTULO 3

TABELA 3.1 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA ANALISADOS POR CLAE-DAD.....	67
TABELA 3.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANTOCIANINAS PRESENTES EM DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (<i>Vitis vinífera</i> E <i>Vitis labrusca</i>).....	71
TABELA 3.3 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (<i>Vitis vinífera</i> E <i>Vitis labrusca</i>).....	78

CAPÍTULO 4

TABELA 4.1 – DIVISÃO E DESCRIÇÃO DOS GRUPOS DE RATOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	90
TABELA 4.2 – GERAÇÃO DE ROS MITOCONDRIAL COM EXTRATO ETANÓLICO 40 % DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (<i>Vitis vinífera</i> E <i>Vitis labrusca</i>).....	101
TABELA 4.3 – ESTRESSE OXIDATIVO NO HOMOGENATO DE FÍGADOS DE RATOS HOLTZMAN.....	102
TABELA 4.4 – ESTRESSE OXIDATIVO NO HOMOGENATO DE CÉREBRO DE RATO HOLTZMAN.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AMG	Amiloglucosidase
AOA	Percentual de inibição da oxidação
AOAC	<i>Association of official agricultural chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
BHT	2,6-Di-terc-butil-4-metilfenol
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração efetiva pela redução de 50 % da concentração inicial
CFT	Compostos fenólicos totais
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
COAVITI	Cooperativa Agroindustrial de Viticultores
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DR _C	Taxa de degradação do controle
DR _S	Taxa de degradação da amostra
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database</i>
FRAP	<i>Ferric reduction antioxidant power</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
MDA	Dialdeído malônico
PEDB	Polietileno de baixa densidade
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SET	<i>Single Electron Transfer</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O HISTÓRICO DO CULTIVO DE UVA	19
1.2 PROCESSAMENTO DA UVA.....	22
1.3 BAGAÇO DE UVA	24
1.4 COMPOSTOS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES	26
1.4.1 Radicais livres.....	26
1.4.2 Antioxidantes	27
1.5 ARTRITE REUMATOIDE E ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE	36
1.6 ESTADO DA ARTE	38
2 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE BAGAÇOS DE UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i> E <i>VITIS LABRUSCA</i>) E COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)	41
RESUMO	41
2.1 INTRODUÇÃO	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.2.1 AMOSTRAS	43
2.2.2 COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA.....	44
2.2.2.1 Teor de umidade	44
2.2.2.2 Cinzas totais.....	44
2.2.2.3 Lipídeos totais.....	44
2.2.2.4 Proteínas totais.....	44
2.2.2.5 Fibras alimentares: fibras solúveis e insolúveis.....	45
2.2.2.6 Minerais.....	45
2.2.2.7 Acidez titulável.....	45
2.2.2.8 Carboidratos.....	46
2.2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	46
2.2.3.1 Extração dos compostos fenólicos totais	46
2.2.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais	46
2.2.3.3 Determinação dos flavonoides totais.....	47
2.2.3.4 Determinação de antocianinas monoméricas totais	47
2.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
2.3.1 COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA.....	48
2.3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	51
2.4 CONCLUSÕES	55
3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i> E <i>VITIS LABRUSCA</i>) DIFERENTES TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS	57
RESUMO	57

3. 1 INTRODUÇÃO	58
3. 2 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.2.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS NÃO ANTOCIÂNICOS	59
3.2.1.1 <i>Extração</i>	59
3.2.1.2 <i>Análise dos ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD</i>	60
3.2.2 ANÁLISE DE COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS	61
3.2.2.1 <i>Extração</i>	61
3.2.2.2 <i>Análise de antocianinas por CLAE-DAD e CLAE-EM</i>	61
3.2.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	63
3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.3.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS NÃO ANTOCIÂNICOS	64
3.3.2 ANÁLISE DE COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS	69
3.3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	76
3.4 CONCLUSÕES	79
4 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE BAGAÇOS DE UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i> E <i>VITIS LABRUSCA</i>)	82
RESUMO	82
4.1 INTRODUÇÃO	83
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	85
4.2.1 EXTRAÇÃO	85
4.2.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS NÃO BIOLÓGICOS	85
4.2.2.1 <i>Atividade sequestrante do radical livre DPPH[•]</i>	85
4.2.2.2 <i>Atividade sequestrante de radical ABTS^{•+}</i>	86
4.2.2.3 <i>Auto-oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico</i>	86
4.2.2.4 <i>Método de redução do ferro (FRAP)</i>	87
4.2.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	88
4.2.3.1 <i>Extração</i>	88
4.2.3.2 <i>Experimentos com mitocôndrias isoladas</i>	88
4.2.3.3 <i>Análise estatística</i>	89
4.2.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i>	89
4.2.4.1 <i>Manipulação dos animais</i>	89
4.2.4.2 <i>Indução da artrite</i>	90
4.2.4.3 <i>Ensaio oxidativos</i>	91
4.2.4.4 <i>Análise estatística</i>	92
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4.3.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS NÃO BIOLÓGICOS	92
4.3.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	100
4.3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i>	102
4.4 CONCLUSÕES	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO GERAL

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo com aproximadamente 75 milhões de toneladas em 2014 (FAOSTAT, 2014). No Brasil, há predominância do cultivo de uvas da espécie *Vitis vinífera* para elaboração de vinhos finos e da espécie *Vitis labrusca*, caracterizada pelas uvas americanas e híbridas utilizadas na elaboração tanto de vinhos de mesa e sucos quanto para o consumo *in natura*.

Estima-se que cerca de 80% das uvas produzidas é destinada a fabricação de vinhos. Neste processo de industrialização são gerados resíduos líquidos e sólidos. Entre os resíduos sólidos estão as grainhas, o engaço, as sementes e o bagaço, sendo este último, o mais representativo entre os resíduos, por corresponder entre 10 a 20% em massa do total produzido. Com isso, o setor vitivinícola enfrenta um problema de descarte destes resíduos, porque embora sejam biodegradáveis, necessitam de um determinado tempo para serem mineralizados.

O bagaço de uva pode conter diferentes compostos bioativos, como os compostos de natureza flavonoide (flavanois, flavonois, flavonas, antocianidinas, entre outros) e os compostos de natureza não flavonoide (ácidos fenólicos, benzoicos, cinâmicos e estilbenos), os quais permanecem no resíduo devido a sua extração incompleta durante o processamento. Apesar disso, o bagaço de uva ainda é utilizado como adubo ou na alimentação animal.

Os compostos bioativos presentes na uva e, conseqüentemente do bagaço de uva, não estão somente relacionados aos compostos fenólicos, mas também, estão associados aos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas sementes, como os ácidos linoleico e linolênico que são essenciais visto que não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Além disso, os compostos bioativos podem apresentar diversas atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, capacidade de sequestrar eletrólitos, capacidade de quelar metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares. Desta forma, os compostos bioativos podem proteger os constituintes celulares e limitar o risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo tecidual e nos sítios de inflamação em certas doenças, como por exemplo, a artrite reumatoide.

Existem estudos sobre a composição e determinação de compostos bioativos no bagaço de uva, entretanto, são pesquisas relacionadas às frações separadas do bagaço de uva constituído por cascas, sementes e polpa. Enquanto que, ainda há poucos estudos que

contemplem as características físicas e químicas, o perfil dos compostos fenólicos remanescentes e o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do bagaço de uva, composto por semente, casca, engaço e remanescente de polpa, em sua totalidade, considerando todo o resíduo gerado pela indústria.

Com base no exposto, este trabalho tem o objetivo de avaliar bagaços de uva das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix (Bordô, Isabel e BRS Violeta) e Terci, com relação à presença de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de possibilitar o reaproveitamento e incentivar novas pesquisas de aplicação tecnológica deste subproduto.

Assim, este trabalho está dividido em quatro capítulos, sendo que no Capítulo 1 consta uma revisão da literatura, no Capítulo 2 é apresentada a caracterização das amostras de bagaço de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) por meio das análises físicas e químicas, assim como a composição fenólica por meio das análises espectrofotométricas de ultravioleta-visível (UV-Vis). No Capítulo 3 diferentes métodos cromatográficos são explorados para determinar o perfil fenólico e de ácidos graxos. E, por fim, o Capítulo 4 descreve a análise da capacidade antioxidante por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os bagaços de uva das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix (Bordô, Isabel e BRS Violeta) e Terci com relação à presença de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* para possibilitar o seu reaproveitamento.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar física e quimicamente os bagaços de uva das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix (Bordô, Isabel e BRS Violeta) e Terci.
- Estimar o teor de compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides totais nos bagaço de uva por espectrofotometria ultravioleta-visível.
- Extrair e quantificar os ácidos fenólicos e flavonoides do bagaço de uva através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

- Identificar as antocianinas majoritárias do bagaço de uva por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).
- Obter o perfil de ácidos graxos presentes na fração lipídica do bagaço de uva com base em cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID).
- Analisar a capacidade antioxidante do extrato do bagaço de uva por meio dos métodos *in vitro*: DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico.
- Estimar o potencial antioxidante dos compostos bioativos sobre o estado oxidativo em ratos com artrite induzida por adjuvante.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O HISTÓRICO DO CULTIVO DE UVA

As uvas são frutos pertencentes à ordem *Ramnideae*, família *Vitaceae*, subfamília *Ampelideae*, gênero *Vitis*, subgênero *Euvitis*. No caso do gênero *Vitis* são conhecidas entre 50 e 60 espécies e, cada uma das espécies possui diferentes variedades. As espécies *Vitis vinífera*, *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* e *Vitis rotundifolia* são as mais cultivadas, seja para produção de vinhos ou para consumo *in natura* (VEDANA, 2008; ISHIMOTO, 2008).

No Brasil, as primeiras variedades de uva foram trazidas pelos portugueses em 1532, durante o período de colonização. As variedades cultivadas eram de uvas finas (*Vitis vinífera*) procedentes de Portugal e da Espanha. Entretanto, a viticultura brasileira apenas se consolidou no século XIX, com a substituição dos vinhedos de uvas europeias pelo cultivo das variedades de uva americanas, como a variedade Isabel (*Vitis labrusca*), trazida pelos imigrantes italianos. No século XX, com a instalação de empresas multinacionais, no sul do país, ligadas à produção de vinhos finos houve um grande estímulo governamental para a volta do cultivo das uvas finas (*Vitis vinífera*), principalmente, no Rio Grande do Sul. Neste período, houve também uma expansão da produção de uvas finas de mesa em regiões de clima tropical (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2009; CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

A viticultura tropical brasileira foi definitivamente desenvolvida com o plantio de uvas finas de mesa a partir da década de 1960, no Semiárido Nordeste, principalmente no Vale do Rio São Francisco. Nos anos 70, o Norte do Paraná iniciou o desenvolvimento da viticultura e na década de 1980, as regiões do Noroeste de São Paulo e Norte de Minas Gerais também começaram o cultivo da uva (Figura 1.1) (LEÃO; POSSÍDIO, 2000; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006). Atualmente, há também registros do desenvolvimento da cultura vitivinícola em regiões como Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e Nordeste (Bahia e Ceará) (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

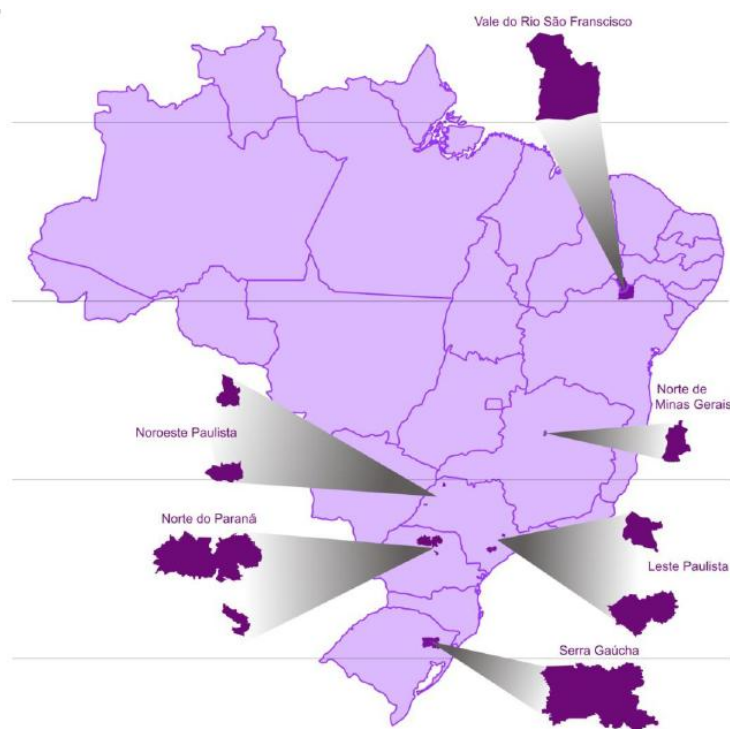


FIGURA 1.1 – REGIÕES BRASILEIRAS DE CULTIVO DE UVAS FINAS E UVAS DE MESA
Fonte: CAMARGO; MAIA; RITSCHER (2010)

Atualmente, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO (FAOSTAT, 2014), a uva está entre as frutas mais cultivadas no mundo, com produção em torno de 75 milhões de toneladas na safra 2013/2014, conforme pode ser observado na Figura 1.2. O maior produtor mundial é a China (11,55 milhões de toneladas), seguida por Itália (8,01 milhões de toneladas), Estados Unidos da América (7,75 milhões de toneladas), Espanha (7,48 milhões de toneladas) e França (5,52 milhões de toneladas). Na América do Sul, o Brasil ocupa a terceira posição, com produção de 1,44 milhão de toneladas, atrás apenas do Chile (3,30 milhões de toneladas) e Argentina (2,88 milhões de toneladas).

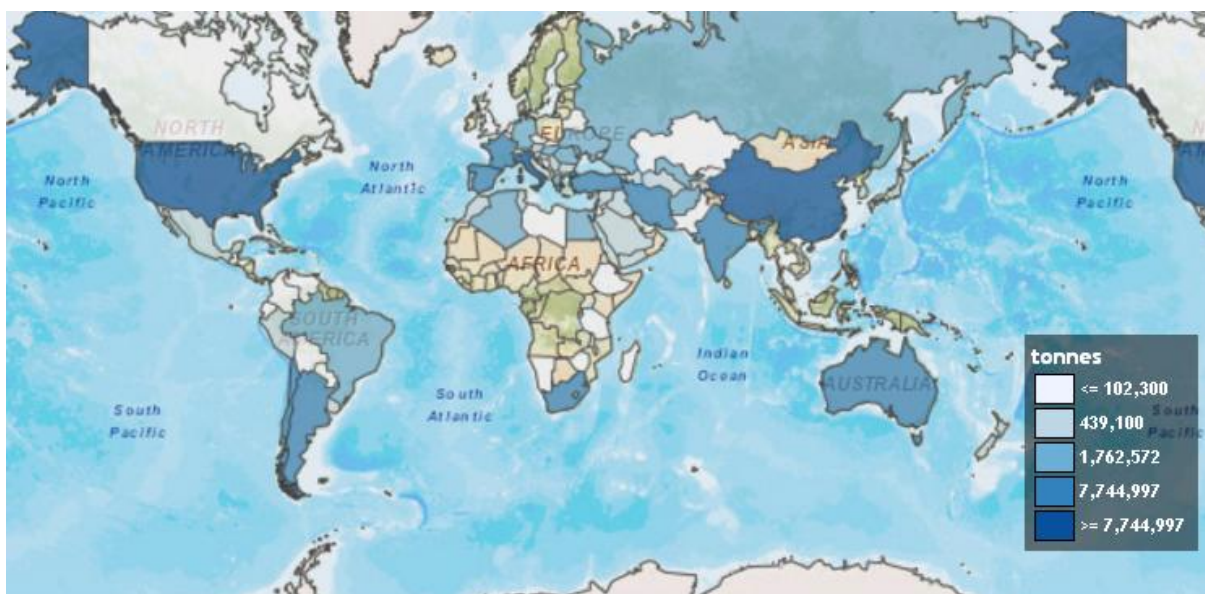


FIGURA 1.2 – PRODUÇÃO MUNDIAL DE UVAS FINAS E UVAS DE MESA, SAFRA 2013/2014
Fonte: FAOSTAT (2014)

No Brasil, a produção de uvas está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. O setor vitivinícola é caracterizado pela diversidade, pois é formado por várias cadeias produtivas que cultivam uvas finas, americanas e híbridas tanto para elaboração de vinhos finos, vinhos de mesa, sucos quanto para o consumo *in natura*. As principais espécies cultivadas são a *Vitis vinífera* e a *Vitis labrusca*. A espécie *Vitis vinífera* é composta por diversas variedades, entre as principais estão Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat, Syrah, Chardonnay, entre outras, sendo destinadas para a produção de vinhos finos, enquanto que as variedades Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Red globe são variedades de mesa. Já a espécie *Vitis labrusca* e seus híbridos constituem a base da produção de vinho de mesa e sucos de uva e representam mais de 85% do volume de uvas produzidas no país. Além disso, elas são usadas para o consumo *in natura*, entre as principais variedades dessa espécie estão Bordô, BRS Rúbea, Isabel, Concord, Niágara, e Moscato (SAUTTER, 2003; CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005; CAMARGO; NACHTIGAL, 2007). Em 2014, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinhos, sucos e derivados) foi de 673,42 mil toneladas, representando 46,89 % da produção nacional. Enquanto que o restante da produção, 53,11 %, foi destinado para o consumo *in natura* (MELLO, 2015).

No Paraná, a viticultura está concentrada nas regiões norte e noroeste do estado, compreendendo os municípios de Londrina, Maringá, Rolândia e Marialva, sendo este último município o responsável por 50,34 % da produção estadual. Nestas regiões, predomina a

produção de uvas finas de mesa com duas safras anuais, uma regular, com a colheita realizada nos meses de dezembro e janeiro e, a outra fora de época, com a obtenção de uvas em abril e maio, com maior produção das variedades Itália, Rubi, Benitaka e Brasil. E, entre as variedades híbridas estão a BRS Carmen, a BRS Rúbea e a BRS Violeta. As variedades de uvas finas como Bordô, Isabel, Concord, Cabernet Sauvignon e Merlot entre outras, são cultivadas nas regiões oeste, sudoeste e, também na região Metropolitana de Curitiba, nos municípios de Campo Largo, Colombo e São José dos Pinhais. Em geral, a produção de uvas no Paraná é predominante em pequenas propriedades com uso de mão de obra familiar (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006; CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

1.2 PROCESSAMENTO DA UVA

Além do consumo *in natura*, a uva apresenta elevado potencial na elaboração de diversos produtos da indústria de alimentos, como vinhos, espumantes, sucos, vinagres, doces, geleias e passas (CAPANOGLU et al., 2013). Além disso, é utilizada pela indústria cosmética, a farmacêutica e a de tintas. Entre as várias aplicações da uva, destaca-se a produção de vinhos que corresponde aproximadamente a 71% da produção mundial de uvas (FREITAS, 2007; CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

O processo de produção do vinho inicia-se com a colheita, recepção das uvas, desengaçamento e esmagamento, fermentação, afinamento, maturação do vinho, filtragem, engarrafamento, rotulagem e análises do vinho, no caso do vinho tinto de guarda tem a etapa de envelhecimento, como pode ser observado na Figura 1.3, onde é apresentado um diagrama simplificado das etapas de fabricação de vinhos tintos.

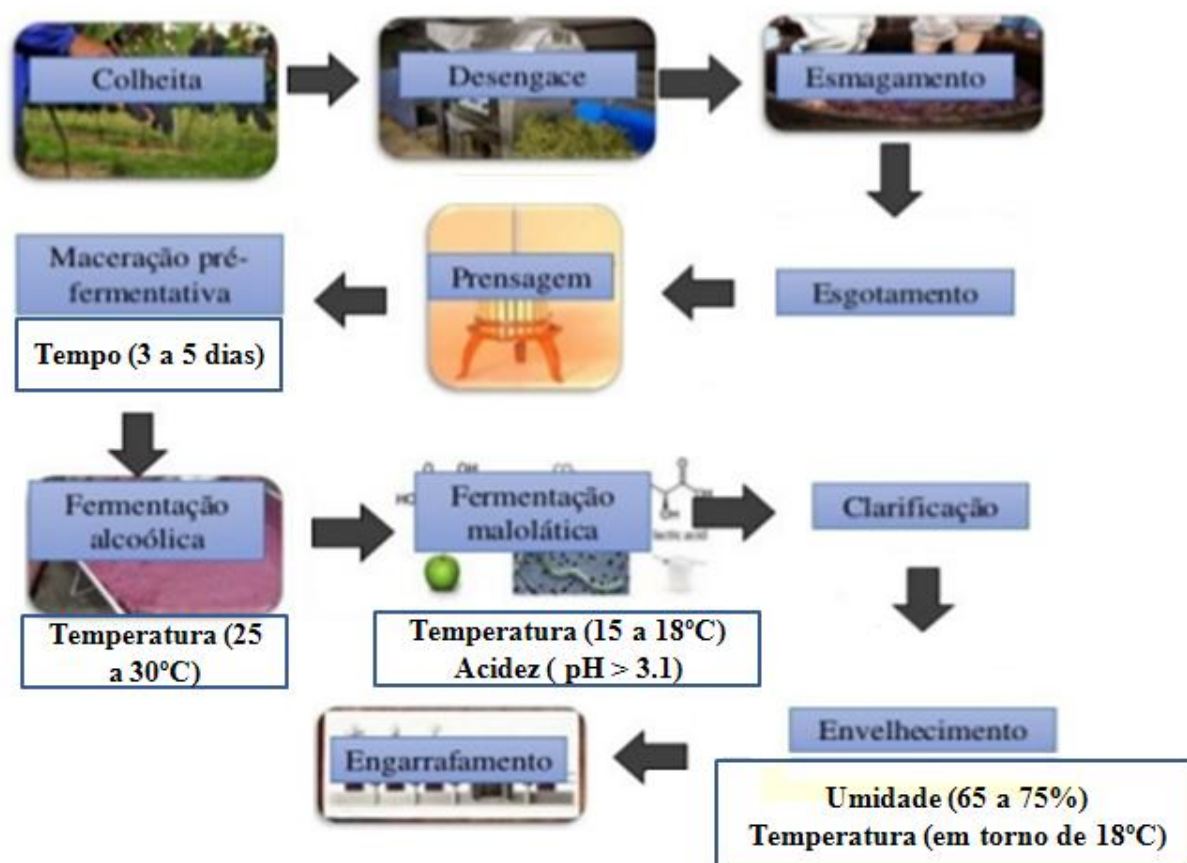


FIGURA 1.3 – DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINHO TINTO
 Fonte: Adaptado de Ferreira (2010); Teixeira (2014)

A colheita é realizada quando a uva apresentar bom estado de maturação, tanto em relação ao teor de açúcar, como de acidez, compostos fenólicos e constituintes aromáticos. Em seguida, as uvas são transportadas para o setor de produção onde serão esmagadas e prensadas. No caso do processo de fabricação dos vinhos tintos, as cascas são conservadas e nos vinhos brancos elas são separadas. Após, tem-se a fermentação do mosto que é realizada em toneis de madeira ou aço inox a uma temperatura de 25 °C a 30 °C. Com a finalidade de extrair pigmentos que conferem cor ao vinho, a casca e as sementes permanecem em contato com o mosto por 2 a 5 dias, este processo é conhecido como maceração. Após este período, tem-se o processo de separação da parte sólida e líquida do mosto, denominado descuba. Em seguida, ocorre o processo de afinamento ou clarificação, onde há a coagulação de partículas suspensas causadoras da turbidez na bebida. A maturação é feita em barris de madeira, preferencialmente carvalho, ou tanques de aço inoxidável. Esta operação permite que se desenvolvam no vinho, em repouso, as suas características aromáticas e o sabor. Depois é realizada a filtragem do vinho para remoção das partículas em suspensão. Por último, é feito o

engarraamento e a rotulagem dos vinhos. Em vinhos do tipo guarda, é realizado o envelhecimento na garrafa, em caves climatizadas, que pode ter duração de um mês a vários anos (RIZZON; MANFROI, 2006; SANTOS et al., 2007).

1.3 BAGAÇO DE UVA

No processo de industrialização da uva para obtenção de sucos, vinhos e derivados, são gerados resíduos sólidos e líquidos. No caso do processo de vinificação, entre os diversos resíduos sólidos gerados, estão as grainhas, o engaço, as sementes e o bagaço, sendo este último o mais representativo. Estima-se que, em 2014, foram gerados aproximadamente 3,5 milhões de toneladas de bagaço de uva, o que torna esse setor uma potencial fonte geradora de resíduos, principalmente porque apenas uma pequena quantidade desse material é reaproveitada, sem qualquer pré-tratamento (RUBERTO et al., 2007; MELLO, 2010; FAOSTAT, 2014).

Como o bagaço é resultante da etapa de esmagamento ou prensagem das uvas, a sua composição química varia de acordo com a variedade e tipo de uva, regiões onde foram produzidas, safra e a intensidade da prensagem sofrida no processo industrial. Este resíduo pode conter compostos que não foram totalmente extraídos da casca e semente da uva durante o processo de fabricação do vinho, como polifenóis, flavonoides, antocianinas, entre outros compostos (Figura 1.4) (SILVA, 2003; KAMMERER et al., 2004; CAMPOS, 2005; CLIFF; KING; SCHLOSSER, 2007; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007).

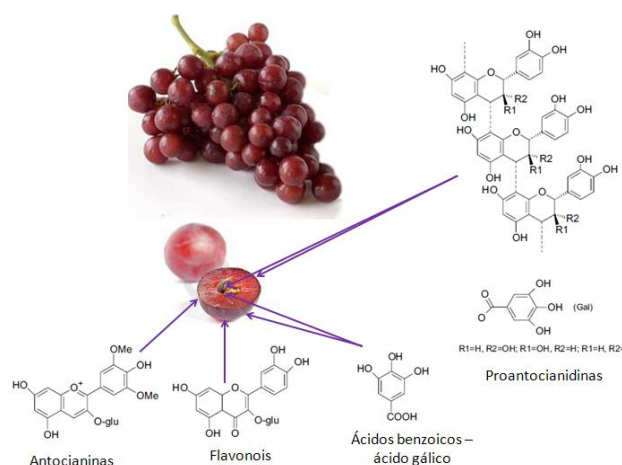


FIGURA 1.4 - PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NAS CASCAS E SEMENTES DA UVA.

Fonte: Adaptado de PINELO; ARNOUS; MEYER (2006)

O bagaço de uva pode ser composto por cascas, sementes, engaços e os restos da polpa da uva, dependendo do processo de produção industrial. A casca, parte externa da fruta contém principalmente água, fibras, compostos fenólicos, enzimas, além de ser uma fonte de flavanois, ácidos fenólicos, flavonois como rutina, quercetina e as antocianidinas, antocianinas que conferem cor característica. A parede celular das cascas é constituída também por polissacarídeos neutros (celulose, xiloglucanas, arabinanas, galactanas), substâncias pécticas (elevado grau de metil esterificação), proantocianidinas insolúveis e proteínas estruturais. As cascas representam cerca de 5 a 10% do total em base seca de uva e agem como uma barreira hidrofóbica para proteger as uvas de agressões físicas e climáticas, desidratação, doenças transmitidas por fungos e radiação ultravioleta (UV) (LECAS; BRILLOUET, 1994; PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006; LUQUE – RODRÍGUEZ; CASTRO; PÉREZ – JUAN, 2007; IACOPINI et al., 2008).

As sementes constituem uma porção considerável no bagaço de uva, em torno de 38 a 52%, em base seca. A composição das sementes é formada por 40% fibras, 14 a 17% óleo, 11% proteínas, 7% compostos fenólicos complexos como taninos e outras substâncias como açúcares e minerais. Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais lipídeos presentes nas sementes, sendo o ácido linoleico seu constituinte majoritário, em torno de 72 a 76% do total de lipídeos. Apresentam ainda, proantocianidinas, responsáveis pela adstringência, catequinas e epicatequinas, e em menores quantidades ácido gálico e resveratrol (BAÑÓN et al., 2007; LUQUE – RODRÍGUEZ; CASTRO; PÉREZ – JUAN, 2007; BOZAN, TOSUN, ÖZCAN, 2008; CAMPOS et al., 2008; GHAFOR et al., 2009; ROCKENBACH et al., 2012; TOALDO et al., 2013).

O engaço é a parte herbácea que suporta os grãos de uva, é rico em minerais e compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico, no entanto, apresenta baixo teor de açúcares e ácidos orgânicos (AQUARONE et al., 2001; LUQUE – RODRÍGUEZ; CASTRO; PÉREZ – JUAN, 2007). Já a polpa constitui a parte principal do grão de uva, cerca de 83 a 92% do grão. Os principais constituintes são água, açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais, compostos nitrogenados, compostos fenólicos, vitaminas e enzimas (AQUARONE et al., 2001). Resumidamente, os principais compostos fenólicos presentes na casca, semente e engaço estão descritos na Tabela 1.1 (PINELO; ARNOUS; MEYERS, 2006)

TABELA 1.1 – PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM DIFERENTES FRAÇÕES DA UVA

Compostos (mg g ⁻¹)	Bagaço de uva	Casca	Semente	Engaço
Ácidos Fenólicos	0,03 – 8,31	0,17 – 8,23	0,10 – 0,11	0 – 0,04
Flavan-3-óis totais	0,34 – 4,25	0,12 – 3,38	3,56 – 6,15	0,22 – 0,89
Antocianinas totais	11,47 – 29,82	11,47 – 29,82	-	-
Flavonois totais	0,03 – 0,63	0,48 – 0,63	0,02 – 0,05	0 – 0,22

Fonte: Adaptado de PINELO; ARNOUS; MEYERS (2006)

Apesar do bagaço de uva conter compostos bioativos em quantidades significativas, ainda é subutilizado. Atualmente, o bagaço de uva é aproveitado na ração animal e como adubo de vinhedos, mas uma quantidade considerável ainda é desperdiçada, o que por um lado, torna-se um grave problema ambiental, porque além de ser gerado um elevado volume de resíduo, a sua composição é caracterizada pelo pH baixo e elevados teores de compostos fenólicos, antibacterianos e fitotóxicos. Mas, por outro lado, há um grande interesse na recuperação dos compostos fenólicos que são reconhecidamente compostos com atividade antioxidante e potencialmente bioativos (BUSTAMANTE et al., 2008; ROCKENBACH et al., 2011a).

1.4 COMPOSTOS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES

1.4.1 Radicais livres

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração faz dos radicais livres moléculas muito instáveis, altamente reativas e com tempo de meia vida curto. Para atingir a estabilidade, essas moléculas precisam adquirir ou perder elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos que estão ao seu redor (HALLIWELL, 1996; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os radicais livres podem ser gerados tanto por processos endógenos quanto por processos exógenos. As fontes endógenas de radicais livres incluem moléculas que atuam de forma intracelular e que são formadas dentro das células e liberadas para o meio extracelular. Durante os processos fisiológicos, os radicais livres podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas celulares. Além disso, os radicais livres participam dos processos de fagocitose, de sinalização celular e o seu alvo celular podem ser as proteínas, os lipídeos ou o ácido desoxirribonucleico (ADN), podendo provocar reações em cadeia causando danos a um grande número de moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

As oxidases e os sistemas de transporte de elétrons são as principais fontes intracelulares e contínuas de radicais livres, ou também denominadas, espécies reativas. Quando derivadas do metabolismo do oxigênio são conhecidas por espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS - *reactive oxygen species*), sendo que o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlete (1O_2) são as principais espécies reativas. Enquanto que as espécies reativas derivadas do metabolismo de nitrogênio são denominadas de ERN (RNS - *reactive nitrogen species*) e as principais são o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (RAHMAN, 2007).

No caso dos radicais livres gerados por processos exógenos, temos como exemplos de fontes geradoras a radiação, o tabagismo, a poluição, o álcool, os fármacos e as diversas substâncias tóxicas como solventes, herbicidas e drogas (SOARES, 2002). Para regular os efeitos das EROs e/ou ERNs existem moléculas que equilibram as suas ações, chamadas de antioxidantes.

1.4.2 Antioxidantes

Antioxidantes podem ser definidos como compostos, naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que têm propriedade de diminuir ou inibir significativamente o processo oxidativo em sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* de outras substâncias como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2003).

Os antioxidantes são classificados em dois grupos distintos: enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). Enquanto que os antioxidantes não enzimáticos são compostos por moléculas com capacidade de proteger determinados alvos biológicos contra a oxidação. Tais moléculas podem ter origem endógena ou podem ser obtidas através da dieta. Dentre os antioxidantes obtidos pela dieta, estão incluídas micromoléculas lipofílicas e hidrofílicas, com capacidade de atuar em compartimentos biológicos, apolares e polares, respectivamente. As principais substâncias deste grupo são: tocoferol, o ascorbato, os carotenoides e os compostos fenólicos (SIES, 1993; BONNEFOY, DRAI, KOSTKA, 2002; HUANG, OU, PRIOR, 2005; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Entre os antioxidantes presentes nos alimentos, os compostos fenólicos estão entre os que mais se destacam. As propriedades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à sua

capacidade sequestradora de espécies radicais, principalmente devido às hidroxilas vicinais ligadas ao anel aromático (HALLIWELL et al., 1995). Os compostos fenólicos podem ainda quelar metais de transição, impedindo que estes participem de reações redox e prevenindo, conseqüentemente, eventos oxidativos. Além disso, são atribuídos aos compostos fenólicos vários efeitos benéficos à saúde como inibir a atuação de radicais livres e apresentar atividade antialérgica, anti-inflamatória e anticancerígena (BRAVO, 1998; FERGUSON, 2001; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Existem cerca de 8000 diferentes compostos fenólicos encontrados na natureza, que englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Quimicamente, são constituídos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxil substituintes no anel, incluindo seus derivados funcionais. Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo suas cadeias carbônicas, magnitude de suas massas moleculares, distribuição na natureza, entre outras formas (SHAHIDI; NACZK, 1995; BRAVO, 1998; MALACRIDA; MOTTA, 2005; ANGELO; JORGE, 2007; DAI; MUMPER, 2010). Segundo Harborne e Simmonds (1964) a classificação dos compostos fenólicos pode ser realizada com base no número de carbonos na molécula. Entretanto, para Ribéreau-Gayon (1972), os grupos fenólicos podem ser agrupados basicamente em três famílias: a) Fenois amplamente distribuídos (presentes em todas as plantas ou de importância específica em plantas), b) Fenóis que são pouco conhecidos, c) Constituintes fenólicos presentes sob a forma de polímeros.

Outra classificação possível para os compostos fenólicos é a sua divisão em dois grupos: compostos de natureza flavonoide e compostos de natureza não flavonoide. Fazem parte do primeiro grupo os flavanois, flavonois, flavonas, antocianidinas, isoflavonas e as flavononas. Enquanto o segundo grupo é composto por ácidos fenólicos, ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e estilbenos (CABRITA; DA SILVA; LAUREANO, 2003).

Os flavonoides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina pela via metabólica do ácido chiquímico e constituem a maior classe de fenólicos vegetais. A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por um anel pirano C (Figura 1.5) (MERKEN; BEECHER, 2000; TSAO; YANG, 2003; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

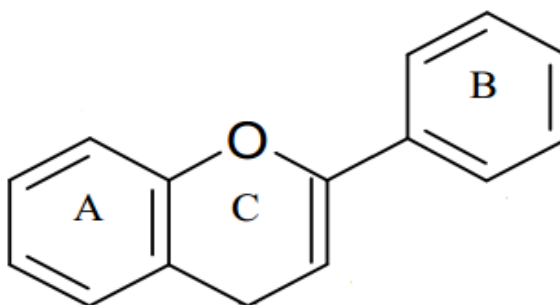


FIGURA 1.5 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES
 FONTE: BEHLING et al. (2004)

Existem em torno de 14 classes em que os flavonoides são subdivididos. Esta classificação depende das variações na substituição do anel C e do seu nível de oxidação. A diversidade estrutural destes compostos pode ser atribuída às modificações causadas por reações de oligomerização, alquilação, hidroxilação, metilação e glicosilação. Entre os flavonoides destacam-se seis classes consideradas essenciais na dieta humana: os flavanois (catequina, epicatequina); flavonois (quercetina e caempferol); flavonas (rutina, apigenina, luteoleína); antocianidinas (cianidina, petunidina, malvidina); isoflavonas (genisteína, coumestrol, daidzeína) e as flavononas (mirecetina, hesperidina, naringina, naringenina) (Figura 1.6). Além das variações relacionadas ao anel C, há também diferenças relacionadas à substituição dos anéis A e B, os quais podem ser encontrados na natureza sob a forma de agliconas, glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados, as modificações no anel central dessas substâncias levam as classes citadas anteriormente como flavanóis, antocianidinas, e assim sucessivamente (HOLLMAN; KATAN, 1999; PIETTA, 2000; BALASUNDRAM; SUNDARAM; SAMMAN, 2006; COUTINHO, MUZITANO, COSTA, 2009).

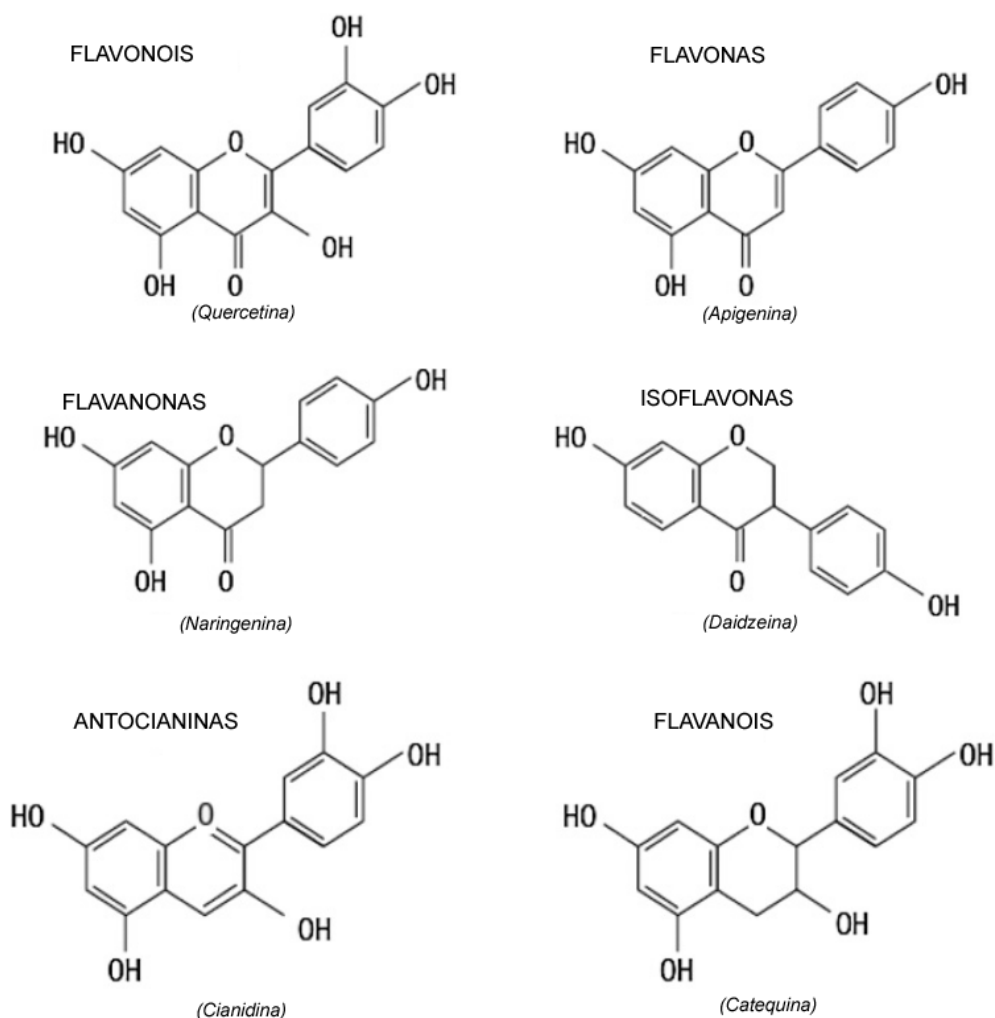


FIGURA 1.6 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES
 FONTE: Adaptado de IGNAT; VOLF; POPA (2011)

A maioria das classes dos flavonoides apresentam características biológicas e químicas em comum, como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, sequestrar eletrófilos, quelar metais como ferro e cobre, por exemplo, potencial para produzir peróxido de hidrogênio na presença de alguns metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Entre os flavonoides amplamente distribuídos na natureza, têm-se as antocianinas. Quando se encontram sob a forma de glicosídeos, denominam-se antocianidinas, que são instáveis em água e muito menos solúveis que as antocianinas (COULTATE, 1984; CABRITA; SILVA; LAUREANO, 2003). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3, onde os açúcares glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose são mais comumente ligados às antocianidinas (WROLSTAD; DURST; LEE, 2005; MALACRIDA; MOTTA, 2006).

As antocianidinas consistem de um anel aromático A ligado a um anel heterocíclico C, que por sua vez está ligado a um terceiro anel aromático B. Na Figura 1.7, observam-se as estruturas das principais antocianidinas, a cianidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina, a pelargonidina e a malvidina, porém existem em torno de 22 agliconas, as quais apresentam variações devido às substituições glicosídicas (LEE; RENNAKER; WROLSTAD, 2008; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

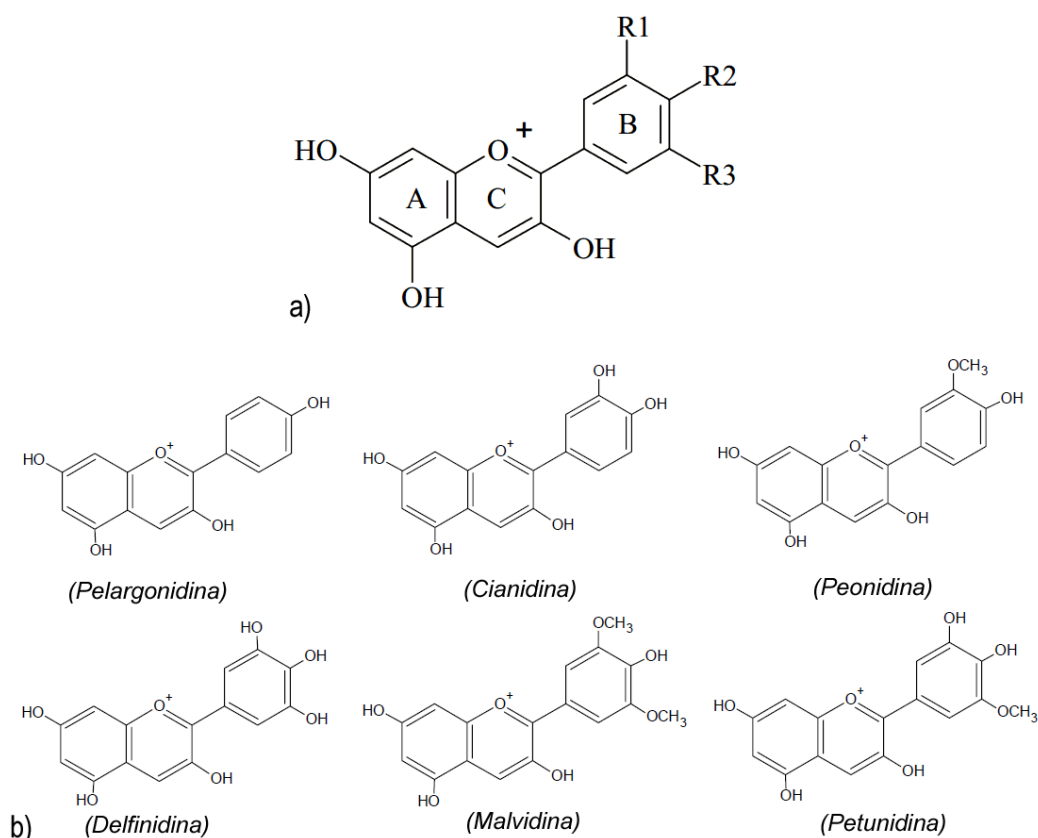


FIGURA 1.7 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTOCIANIDINAS: A) ESTRUTURA BÁSICA COM O CÁTION FLAVILIUM E B) PRINCIPAIS ANTOCIANIDINAS

FONTE: Adaptado de REIN (2005)

As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito susceptíveis a degradação. Os principais fatores que afetam a sua estabilidade são a estrutura química, temperatura de armazenagem, presença de enzimas, luz, oxigênio, pH, estrutura e concentração das antocianinas, e presença de outros compostos como flavonoides, proteínas e minerais (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; REIN, 2005; CASTAÑEDA – OVANDO et al., 2009).

As antocianinas são mais estáveis em meio ácido do que em soluções alcalinas, com valores elevados de pH. A natureza iônica destes compostos permite alterações na estrutura da

Na uva, a quantidade de antocianinas varia de acordo com alguns fatores como a maturação, variedade, espécie e fatores edafoclimáticos referentes ao clima e ao solo, e interferentes relacionados ao processamento da uva, como prensagem, tratamentos térmicos, tipos de extração, tratamentos enzimáticos, adição de dióxido de enxofre e ácido tartárico, entre outros (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

Os compostos não flavonoides compreendem os ácidos fenólicos, benzoicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003). Os ácidos fenólicos apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila (SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico, conforme Figura 1.9. Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum (C6–C1) enquanto os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico fazem parte dos ácidos hidroxicinâmicos, compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3) (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006).

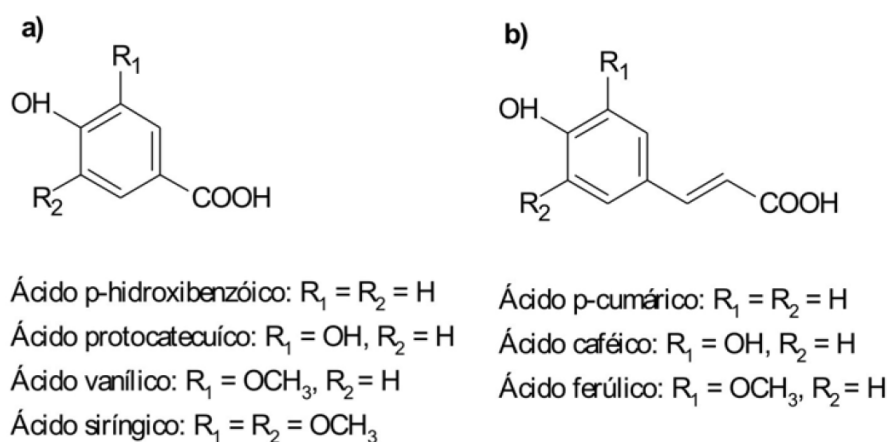


FIGURA 1.9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS (A) E HIDROXICINÂMICOS (B)
 FONTE: ANGELO; JORGE (2007)

Os taninos são os compostos fenólicos que têm a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003). Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensáveis (OSZMIANSKI et al., 2007) sendo que os taninos condensáveis, também conhecidos como proantocianidinas são oligômeros e polímeros de catequina. As

proantocianidinas apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO et al., 2005). Enquanto que os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas, os mais comuns são os ácidos gálico e elágico glicosilados (HAGERMAN; BUTLER, 1981).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides deve-se a uma destas propriedades: supressão da formação de radicais livres (por quelação de metais ou por inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação ou desativação de radicais livres com formação de um produto estável, ou participação em processos de reparo de danos oxidativos (BOURNE; RICE-EVANS, 1999; RIBEIRO et al, 2005). Desta forma, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, depende da estrutura do composto em relação ao número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Assim, devido à complexidade e variedade de compostos fenólicos presentes nos alimentos para estimar sua capacidade antioxidante há a necessidade de combinar diferentes métodos de avaliação que diferem em relação aos mecanismos de reação, com isso, aplicam-se os ensaios *in vitro* e os ensaios *in vivo*, (PRIOR; CAO, 2000; ARNAO, 2000).

Há dois mecanismos principais de ação dos antioxidantes para desativar os radicais livres, um por transferência de um átomo de hidrogênio e outro por transferência de um elétron. O mecanismo por transferência de um átomo de hidrogênio é denominado HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) e mede a capacidade de um antioxidante em eliminar radicais livres doando hidrogênio, entre os ensaios deste mecanismo, pode-se citar o sistema de auto-oxidação β -caroteno/ácido linoleico. Enquanto que no mecanismo por transferência de um elétron, conhecido por SET (*Single Electron Transfer*) se detecta a capacidade de um antioxidante em reduzir um composto (incluindo metais, grupamentos carbonila e radicais livres), por meio da transferência de um elétron, entre os ensaios deste mecanismo, está o ensaio FRAP (*Ferric reducing antioxidant power* - Poder antioxidante de redução do ferro). No entanto, há ainda dois ensaios em que ambos os mecanismos HAT e SET ocorrem, o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolona-6-sulfonado)] (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O ensaio DPPH é um dos métodos mais empregados na determinação da atividade antioxidante. Segundo Molyneux (2004), a intensidade de absorção diminui na presença de um doador de hidrogênio ou elétron proveniente de compostos antioxidantes que se liga ao

nitrogênio do DPPH, desta forma, a solução com o radical perde a cor violeta e torna-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados. Além do método do DPPH, outro método aplicado na determinação da atividade antioxidante é o método ABTS⁺. De acordo com Re et al. (1999), este método é baseado na reação do 2,2'-azino-bis(3-etil-benzolína-6-sulfonado) (ABTS) com persulfato de potássio, com geração do radical ABTS⁺, de cor azul esverdeado. Ao adicionar o antioxidante ao radical pré-formado, ocorre a redução do radical monocatión (ABTS⁺) a novamente ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional. O método ABTS⁺ é um ensaio de atividade antioxidante com elevada estabilidade que oferece resultados reproduzíveis, além de permitir análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) descrevem o método FRAP como o poder antioxidante de redução do ferro, com base na habilidade de redução do complexo Fe³⁺/TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) em complexo ferroso (Fe²⁺) na presença de antioxidantes (redutores) sob condições ácidas (pH 3,6), apresentando intensa coloração azul. Os resultados do ensaio FRAP são obtidos monitorando a redução em 593 nm e são altamente reproduzíveis (BENZIE; STRAIN, 1996; OU et al., 2002). O sistema da co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico para determinação da atividade antioxidante foi inicialmente empregado por Marco (1968) e modificado por Hammerschmidt e Pratt (1978). O método está fundamentado na co-oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa de um ácido graxo (ácido linoleico), cujo resultado é a perda a coloração amarela que é monitorada espectrofotometricamente (ANTOLOVICH et al., 2002; ABDILLE et al., 2005).

Para estimar a capacidade antioxidante dos compostos presentes em um alimento, faz-se necessária à combinação de diferentes métodos que diferem em relação aos mecanismos de reação, as espécies-alvo e as condições em que ocorrem, porque os antioxidantes podem responder de diferentes maneiras aos radicais livres presentes no meio. Desta forma, podem-se aplicar os ensaios *in vitro* e os ensaios *in vivo* para avaliar a capacidade antioxidante.

No caso dos ensaios *in vivo*, pode-se avaliar a capacidade antioxidante sobre o estado oxidativo do plasma e fígado de ratos com diferentes patologias por meio da determinação de proteínas carboniladas e grupos tióis reduzidos de proteínas no plasma, atividade da enzima mieloperoxidase no plasma; geração de espécies reativas ao oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, entre outros diversos mecanismos. Entretanto, a avaliação do desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos e

doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL et al., 1995).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres ou espécies reativas ao oxigênio, e sua eliminação se dá por meio de mecanismos de proteção, os antioxidantes. O aumento da formação de radicais livres solicita uma resposta celular adaptativa através da mobilização ou aumento da biossíntese de antioxidantes endógenos. No entanto, sob certas circunstâncias, o sistema antioxidante é insuficiente para o excesso de radicais livres, levando então, à condição de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004; REUTER et al., 2010).

Desta forma, o estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante, causando lesão em biomoléculas (lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA – ácido desoxirribonucleico); a oxidação de lipídeos por meio da peroxidação lipídica, de proteínas por carbonilação ou nitração, carboidratos por carbonilação e DNA por oxidação de bases nitrogenadas (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. Esta peroxidação é uma reação em cadeia iniciada frequentemente pelo radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). Este processo inclui reações de iniciação (formação dos radicais livres do ácido graxo poli-insaturado devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula), propagação (aparecimento de produtos primários de oxidação devido a formação de compostos instáveis que atuam como propagadores da reação) e terminação (formação de produtos finais estáveis ou não reativos pela combinação de radicais livres uns com os outros) (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Esse desequilíbrio leva a danos de importantes biomoléculas e células, o que causa um grande impacto no organismo. Tais danos oxidativos têm sido relacionados com a etiologia de várias patologias, incluindo aterosclerose, a hipertensão, o mal de Parkinson, a nefropatia, a diabetes, o mal de Alzheimer, a síndrome de *Down*, doenças cardiovasculares, o envelhecimento e a artrite reumatoide (FERNANDES, 2011).

1.5 ARTRITE REUMATOIDE E ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica de origem autoimune que pode afetar diversos tecidos e órgãos, incluindo pele, vasos sanguíneos, coração, pulmões e músculos. Entretanto, a AR é caracterizada, principalmente, por

inflamação crônica e sistêmica que afeta a cartilagem articular, as articulações periféricas, membrana sinovial e ossos, podendo resultar em comprometimento poliarticular (HARRIS, 2005; MOTA et al., 2011).

A artrite reumatoide tem uma prevalência mundial em torno de 0,5 a 1,0% da população adulta, sendo as mulheres duas a três vezes mais acometidas que os homens (GIBOFSKY, 2012). No Brasil, a prevalência da patologia também se dá no gênero feminino, similar à da população mundial, com início após os 40 anos e com maior incidência na faixa dos 50 anos. Além disso, a AR está associada com aumento na taxa de mortalidade em pacientes artríticos, principalmente devido a complicações vasculares inflamatórias e caquexia (SENNA et al., 2004; GABRIEL; MICHAUD, 2009; BLAY et al., 2012; MENEZES, 2013).

A progressão da doença é atribuída a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo nos sítios de lesão e diminuição nas defesas antioxidantes. No entanto, há estudos epidemiológicos que mostram a diminuição do estresse oxidativo e da incidência da AR a partir do consumo de antioxidantes. Neste sentido, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a AR são comumente utilizados modelos experimentais (ensaios *in vivo*) para fornecer subsídios que permitam aumentar o conhecimento sobre os mecanismos da doença e identificar novos agentes terapêuticos.

Desta maneira, realiza-se a indução da artrite por meio da administração de agentes artritogênicos, entre os quais estão o pristane (VINGSBO et al., 1996), o zimosano (GUERRERO et al., 2006), o adjuvante incompleto de Freund (CANNON et al., 1993) e o adjuvante completo de Freund (CFA) (BARTON et al., 2007). Sendo que os modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos têm sido muito utilizados para avaliação de drogas anti-inflamatórias e antirreumáticas porque apresentam características que se assemelham às daquelas da doença humana (artrite reumatoide), tais como a hiperplasia sinovial, a inflamação sistêmica, a caquexia e os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e nos sítios de lesão (BENDELE et al., 1999; SZEKANECZ et al., 2000).

No entanto, existem variações nos modelos de artrite induzida em roedores, os quais estão relacionados a fatores como espécie empregada (rato ou camundongo), tipo de doença (induzida, espontânea ou por modificação genética) e agente indutor (adjuvantes, polissacarídeo, proteoglicanas, colágeno e outras proteínas) que podem interferir nos resultados dos modelos. Apesar disso, muitos modelos experimentais têm contribuído significativamente para o conhecimento da fisiopatogênese da AR e, conseqüentemente, para

o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (BENDELE, 2001; BOLON et al., 2011).

1.6 ESTADO DA ARTE

Os resíduos agroindustriais podem conter quantidade relevante de compostos fenólicos, os quais são considerados antioxidantes. Nesta perspectiva, analisando o processo de vinificação, sabe-se que são gerados em torno de 10 milhões de toneladas de bagaço de uva e, que apenas uma parcela é reaproveitada na alimentação animal, como fertilizante ou adubo. Em geral, uma quantidade considerável ainda é descartada, representando assim, um problema ambiental. Estudos vêm sendo realizados com intuito de indicar possibilidades de reaproveitamento deste resíduo.

Na literatura, estudos como o de Alonso et al., 2002; Gonzalez-Paramas et al., 2004, Kammerer et al., 2004; Kammerer et al., 2005; Pinelo et al., 2005; Llobera; Canellas, 2007; Gonzalez-Centeno et al., 2010; Rockenbach et al., 2011a; Rockenbach et al., 2011b, apontam a presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no bagaço de uva. Além de outros compostos de relevância como ácidos graxos poli-insaturados e minerais (ARVANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006), fibras dietéticas (LLOBERA; CANELLAS, 2007, DENG; PENNER; ZHAO, 2011), vitaminas (CAO; ITO, 2003), entre outros compostos.

No entanto, as pesquisas são referentes às frações do bagaço de uva constituído ou somente por cascas ou contendo também sementes. Enquanto que, ainda há poucos estudos que contemplem as características físicas e químicas, o perfil dos compostos fenólicos remanescentes e o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do bagaço de uva, composto por semente, casca, engaço e remanescente de polpa, em sua totalidade, considerando todo o resíduo gerado pela indústria. Tais informações são fundamentais para agregar valor a este resíduo e melhorar o seu reaproveitamento.

Além disso, há poucos trabalhos que utilizaram o bagaço de uva em ensaios *in vivo*. Entre eles, têm-se o estudo de Martín-Carrón et al. (1999) que avaliaram o efeito na redução do colesterol em ratos normais e hipercolesterolêmicos a partir da alimentação com um produto rico em compostos fenólicos e fibras, obtido do bagaço de uva. O resultado indicou redução no colesterol sérico total.

E o estudo de Murthy, Singh e Jayaprakasha (2002), que analisaram o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do bagaço de uva em diferentes extratos, e perceberam que os resultados obtidos demonstraram uma notável capacidade em remover radicais livres pelo método do DPPH, além de indicarem que o extrato de bagaço de uva foi capaz de proteger a atividade de enzimas hepáticas. Mas, os autores indicam a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na atividade das enzimas e os efeitos protetores contra espécies reativas de oxigênio.

Com base na literatura os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva, apresentam atividade antioxidante, e estes poderiam reduzir o estresse oxidativo tecidual e nos sítios de inflamação em certas doenças, como por exemplo, a artrite reumatoide. Diante dessa situação, é importante buscar novas alternativas que podem contribuir no tratamento da doença, incluindo o uso de fitoterápicos, bem como a utilização de alimentos com antioxidantes naturais na saúde humana.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que estudem a aplicação do bagaço de uva (composto por semente, casca, engaço e remanescente de polpa) em ensaios *in vivo*, sobre a geração de espécies reativas ao oxigênio nas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e, posteriormente, sobre o estado oxidativo em ratos com artrite induzida. Desta forma, o Capítulo 4 do presente trabalho tem caráter inédito.

CAPÍTULO 2

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*) E COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

2 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*) E COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

RESUMO

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo. Destina-se tanto para o consumo *in natura*, como também para a produção de sucos e vinhos. A partir do processo de vinificação é gerada uma quantidade expressiva de resíduos, principalmente, o bagaço de uva, composto por sementes, cascas e engaço. O bagaço de uva apresenta compostos bioativos, os quais permanecem no resíduo devido à extração incompleta durante o processamento. Apesar disso, o bagaço de uva ainda é utilizado como adubo ou na alimentação animal. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição física e química do bagaço de uva bem como o teor dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e as antocianinas totais por espectrofotometria UV-Vis a fim de viabilizar o seu reaproveitamento na indústria de alimentos. As variedades avaliadas foram Cabernet Sauvignon (CS) e Merlot (ME) (*Vitis vinífera* L.), Terci (TE) e Mix (MI) (*Vitis labrusca* L.), composto pelas variedades Bordô, Isabel e BRS Violeta, cada uma nas proporções 65%, 25% e 10%, respectivamente. A composição física e química foi avaliada quanto ao teor de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, açúcares redutores e não redutores, fibras solúveis e insolúveis, acidez titulável e minerais. Os compostos bioativos foram avaliados em espectrofotômetro UV-Vis, sendo que os CFs totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu a 765 nm, os flavonoides totais foram avaliados pelo método de complexação com cloreto de alumínio (AlCl_3) a 510 nm e as antocianinas foram quantificadas pelo método de pH diferencial a 510 e 700 nm. As variedades ME, MI e TE não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância em relação ao teor de fibra alimentar, e os resultados obtidos para estas variedades foram de $58,99 \pm 0,92 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, $56,57 \pm 0,48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ e $57,73 \pm 0,66 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente. Enquanto a variedade CS apresentou os maiores valores tanto para açúcares redutores em glicose ($30,73 \pm 0,38 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) quanto para açúcares não redutores em sacarose ($20,03 \pm 2,07 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Em relação aos minerais, a variedade TE demonstrou ter resultados significativos para potássio ($2418,70 \pm 65,13 \text{ mg kg}^{-1}$), cálcio ($281,43 \pm 3,70 \text{ mg kg}^{-1}$) e ferro ($56,76 \pm 3,31 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto que a variedade ME apresentou os maiores valores de magnésio ($65,58 \pm 2,25 \text{ mg kg}^{-1}$) e fósforo ($343,77 \pm 12,80 \text{ mg kg}^{-1}$) com base no teste de Tukey ($P < 0,05$). A análise dos compostos bioativos constatou que a variedade MI apresentou as maiores quantidades de CFs ($4124,46 \pm 115,01 \text{ mg}$ equivalentes de ácido gálico 100 g^{-1}) e flavonoides totais ($2157,00 \pm 10,01 \text{ mg}$ equivalentes de catequina 100 g^{-1}) em relação as demais variedades. A variedade TE apresentou a maior quantidade de antocianinas totais ($414,95 \pm 3,37 \text{ mg}$ equivalentes de cianidina-3-glicosídeo 100 g^{-1}) e se diferenciou estatisticamente ($P \leq 0,05$) das demais variedades. Desta forma, constatou-se que o bagaço de uva pode ser considerado uma fonte de fibras e minerais bem como de compostos bioativos indicando assim uma possibilidade de aproveitamento deste subproduto do setor vinícola.

Palavras-chave: fibras alimentares, minerais, compostos bioativos, flavonoides.

2.1 INTRODUÇÃO

A uva é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo. Composta basicamente de açúcares solúveis (LLOBERA; CANELLAS, 2007), fibras alimentares (SAURA-CALIXTO, 1998), ácidos orgânicos (SCHIEBER; KAMMERER; CARLE, 2009), pectinas (LLOBERA; CANELLAS, 2007), compostos aromáticos e compostos fenólicos (VATAI et al., 2009; ROCKENBACH et al., 2011b; DENG; PENNER; ZHAO, 2011), os quais estão distribuídos na casca, engaço, folhas e sementes (XIA et al., 2010). Durante o estágio de maturação, há o acúmulo de açúcares, formação de taninos e aromas, e diminuição de ácidos orgânicos (KENNEDY et al., 2001).

Destinada tanto para o consumo *in natura*, como também para a produção de sucos e vinhos. Cerca de 80% da quantidade total de uva produzida é destinada para a produção de vinho (MAIER et al., 2009) e os seus subprodutos correspondem a 20% (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). Com isso, o setor vitivinícola gera um grande volume de resíduos e, portanto, enfrenta um problema de descarte destes subprodutos. No processo de industrialização do vinho são gerados resíduos sólidos e líquidos. Entre os resíduos sólidos estão as grainhas, o engaço, as sementes e o bagaço, sendo este último, o mais representativo entre os resíduos.

O bagaço de uva pode ser composto por sementes, cascas, engaço e remanescentes de polpa. Os compostos fenólicos, como antocianinas, flavanois, flavonois, estilbenos (resveratrol) e ácidos fenólicos, naturalmente presentes na uva, permanecem no bagaço após a vinificação, devido à extração incompleta durante o processamento. A quantidade destes compostos presente no bagaço depende da variedade e do tipo da uva (tintas e brancas), do estágio de maturação, da parte do tecido (cascas ou sementes), da safra e das condições de processo industrial de produção de vinho (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007; XIA et al., 2010).

O bagaço de uva pode conter de 20 a 30% de compostos fenólicos nas cascas e de 60 a 70% de fenólicos nas sementes (YILMAZ; TOLEDO, 2004; MONRAD et al., 2010). Sendo que entre os principais compostos fenólicos presentes neste resíduo, se encontram o grupo dos flavonoides, entre eles os glicosídeos de flavonois e as antocianinas. Estudos relatam que estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, capacidade de sequestrar eletrólitos, capacidade de quelar metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; SILVA; MATIAS; NUNES, 2005;

JACKSON, 2008; HO; RAFI; GHAI, 2010). Além disso, o bagaço de uva é rico em ácidos graxos, provenientes das sementes que contém de 14 a 17% de óleo dependendo da variedade da uva e, minerais (YI et al., 2009; ARVANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006).

Desta forma, o bagaço de uva é uma fonte muito barata de compostos fenólicos. Entretanto, a maior parte desse resíduo ainda é usada para ração animal ou como adubo. Assim, com o intuito de minimizar o impacto ambiental causado por estes resíduos e avaliar a viabilidade de reaproveitá-lo em indústrias de alimentos, este trabalho teve como objetivo caracterizar bagaço de diferentes variedades de uva, em termos de composição química, teor de minerais e caracterizar os compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 AMOSTRAS

Os bagaços de uva foram doados pelas empresas COAVITI (Cooperativa Agroindustrial de Viticultores) – Marialva/PR, Vinícola Franco Italiano – Colombo/PR, Vinhos Durigan – Curitiba/PR e Família Ceccon – Colombo/PR, sendo todos os bagaços de uva provenientes do processamento de vinho de diferentes regiões do estado do Paraná e de diferentes variedades, conforme descrito na Tabela 2.1. A escolha das variedades ocorreu segundo disponibilidade de doação das empresas e período de aquisição das mesmas.

TABELA 2.1 – CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE UVA COM RELAÇÃO À VARIEDADE, PROCEDÊNCIA E PERÍODO DE OBTENÇÃO

Codificação	Variedade	Procedência	Período (mês/ano)
CS	Cabernet Sauvignon (<i>Vitis vinífera</i>)	Curitiba/PR	Fev./2013
ME	Merlot (<i>Vitis vinífera</i>)	Colombo/PR	Fev./2013
MI	Mix (65% Bordô, 25% Isabel e 10% BRS Violeta) (<i>Vitis labrusca</i>)	Marialva/PR	Maio/2012
TE	Terci (<i>Vitis labrusca</i>)	Colombo/PR	Fev./2013

Todas as amostras (bagaço de uva) foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação de ar (TEDESCO TURBO POWER EXPERT) por 36 horas na

temperatura de 80 °C. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho de faca, fracionadas, acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com capacidade de aproximadamente 20 gramas, seladas a vácuo (VC 999 K-3, Suíça) e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram armazenadas à – 20 °C em freezer até o momento das análises.

2.2.2 COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

2.2.2.1 *Teor de umidade*

A determinação do teor de umidade foi realizada em estufa de secagem sem circulação de ar, a 105 °C, até massa constante (AOAC, 2005).

2.2.2.2 *Cinzas totais*

Para determinação de cinzas foram pesados aproximadamente 3,0 g de amostra, e colocadas em cadinhos previamente incinerados e pesados. Os cadinhos com as amostras foram colocados na mufla a 550 °C por 6 horas. Após este período as amostras foram colocadas para resfriar em dessecador, em seguida pesadas e calculado o teor de cinzas, por diferença de massa.

2.2.2.3 *Lipídeos totais*

O teor de lipídeos totais foi determinado por extração sob refluxo, em aparelho de Soxhlet, com éter etílico (Dinâmica, Brasil). Os recipientes foram retirados e secos em estufa a 105 °C, sendo pesados após serem secos e resfriados (AOAC, 2005).

2.2.2.4 *Proteínas totais*

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada segundo o método de Kjeldahl clássico, com fator de conversão de 6,25, de acordo com AOAC (2005).

2.2.2.5 Fibras alimentares: fibras solúveis e insolúveis

A quantificação das fibras alimentares ocorreu por meio de método enzimático, a partir das quantificações das fibras insolúveis e solúveis. Pesou-se em torno de 0,5 g de cada amostra e adicionou-se 50 mL de tampão fosfato 0,008 mol.L⁻¹ (pH 6) mais 0,1 mL da enzima α -amilase (Termamyl® 120 L, Novozymes), permanecendo sob agitação em banho à 100 °C por 15 minutos. Em seguida, foram resfriados e, adicionados 10 mL de NaOH 0,275 mol.L⁻¹ (pH 7,5), 5 mg da enzima protease (Protamex, Novozymes) e foram incubados em banho a 60 °C por 30 minutos, sob agitação. Após, foram adicionados 10 mL de HCl 0,325 mol.L⁻¹ (pH 4,5) e 0,1 mL de amiloglucosidase (AMG) (AMG 300 L, Novozymes), permanecendo também por 30 minutos, em banho à 60 °C sob agitação. Para a determinação das fibras insolúveis, as amostras foram imediatamente filtradas após o final das digestões enzimáticas e mantidas em estufa a 105 °C. Quanto às solúveis, estas foram precipitadas com etanol 96 °GL por 18 horas e filtradas após este período, seguindo para estufa a 105 °C. Após os cálculos para as determinações de cinzas e proteínas foram calculadas a quantidade total de fibra alimentar, porção solúvel mais insolúvel (AOAC, 2000).

2.2.2.6 Minerais

As análises foram realizadas no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA). Em torno de 1,0 g de cada amostra foi digerida em ácido nítrico (HNO₃), sob-refluxo durante 30 minutos. Após a digestão, o extrato obtido foi utilizado para a análise dos seguintes minerais: Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Fósforo (P), Potássio (K). A quantificação dos minerais foi realizada por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES/PE-LE-b033/R01) com padronização externa por meio da elaboração de curvas padrão para cada um dos elementos analisados (AOAC, 2011).

2.2.2.7 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação potenciométrica das amostras em água destilada na proporção 1:20 (m/v), utilizando solução de hidróxido de sódio de concentração 0,1 N. O resultado foi expresso em grama de ácido tartárico por 100 gramas de amostra (GALLANDER et al., 1987).

2.2.2.8 Carboidratos

A análise de carboidratos foi realizada com base na determinação de açúcares redutores em glicose e açúcares não redutores em sacarose segundo metodologia descrita por Somogyi, adaptada por Nelson (1944) com base na curva padrão da solução de glicose entre 50 e 500 mg.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV-1600), em comprimento de onda de 540 nm.

2.2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

2.2.3.1 Extração dos compostos fenólicos totais

As condições do processo de extração foram realizadas com base na metodologia de Haminiuk et al. (2012), com modificações. A extração foi realizada na proporção 1:50 (m/v), onde 0,8 gramas de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) foram transferidos para erlenmeyers e adicionados 40 mL da mistura álcool etílico P.A. (Dinâmica, Brasil) e água destilada, 40:60 (v/v), respectivamente. Os erlenmeyers contendo bagaço de uva e solvente foram submetidos à agitação (TE420, TECNAL, Brasil) a 100 rpm por 24 horas e a temperatura de 25 °C. Após o período de extração, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (Centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL, Fanem, Brasil) a $3493 \times g$ (5.000 rpm) por 25 minutos. Os extratos foram filtrados e armazenados em frascos âmbar sobre refrigeração até o momento das análises.

2.2.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

Após a etapa de extração (item 2.2.3.1) foi realizada a quantificação dos compostos fenólicos segundo Singleton e Rossi (1965), com modificações. Em tubos, foram adicionados 60 µL de extrato das amostras CS, ME, MI e TE na concentração de 40% de álcool etílico, 3.000 µL de água destilada e 300 µL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), esperou-se 3 minutos e foram adicionados 900 µL de carbonato de sódio (15%) (Vetec) e 1740 µL de

água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1600) a 765 nm. Ácido gálico - AG (Sigma-Aldrich) foi usado como padrão, e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg AG g^{-1} de bagaço de uva em base seca) calculados por meio de ajuste da curva padrão do ácido gálico em concentrações que variaram de 50 a 1.000 mg L^{-1} .

2.2.3.3 Determinação dos flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1600) a 510 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 500 μL de extrato das amostras CS, ME, MI e TE na concentração de 40% de álcool etílico, 2500 μL água destilada e 150 μL de nitrito de sódio (5%) (Vetec), após 6 minutos foram misturados 300 μL de cloreto de alumínio hexahidratado (10%) (Vetec). Em seguida, as amostras permaneceram em repouso por 5 minutos e finalmente adicionou-se 1.000 μL de NaOH 1 M (Vetec). Catequina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão em curva com concentrações de 50 a 800 mg L^{-1} , e os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (mg AG g^{-1} de bagaço de uva em base seca) (MEYERS et al., 2003).

2.2.3.4 Determinação de antocianinas monoméricas totais

O conteúdo total de antocianinas dos extratos foi determinado pelo método de pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). As soluções utilizadas foram tampão cloreto de potássio ($0,025 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 1,0) (Vetec) e tampão acetato de sódio ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,5) (Vetec). As amostras foram diluídas na proporção 1:20, onde 200 μL de extrato das amostras CS, ME, MI e TE na concentração de 40% de álcool etílico, foram misturados com 3.800 μL de cada solução tampão. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1600) a 510 nm e 700 nm e calculada conforme a equação 1.

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

A concentração de antocianinas monoméricas (MA) final foi expressa em gramas de cianidina-3-glucosídeo 1.000 mL^{-1} de extrato, conforme a equação 2.

(2)

$$MA = \frac{A \times M \times FD \times 1000}{\varepsilon \times L}$$

Onde:

A é a absorvância calculada na equação 1, M é a massa molecular de cianidina-3-glucosídeo (449,2 g mol⁻¹), FD é o fator de diluição (20), ε é o coeficiente de extinção molar (26.900 L. mol⁻¹ cm⁻¹) e L é o comprimento do caminho óptico da cubeta (1 cm). Os resultados foram expressos em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de bagaço de uva seco.

2.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância com $p \leq 0,05$. As diferenças significativas entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância. O software Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) foi utilizado para as análises.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

Os bagaços de uva das variedades CS, ME, MI e TE após terem sido secos a 80 °C por 36 horas e moídos, foram caracterizados por meio de análises físicas e químicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.2 e expressos em base seca.

Segundo Belitz, Grosch e Schieberle (2009), a composição química da uva em relação aos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e fibras, varia de acordo com a composição do solo onde a fruta foi cultivada, a localização geográfica, o estágio de maturação na colheita, e as diferenças intrínsecas entre as variedades de uva tintas, *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*. Além disso, o bagaço de uva, como subproduto do processo de vinificação, também pode apresentar diferenças quanto a sua composição dependendo de como é o processo industrial na etapa de prensagem e sua eficiência. Desta forma, a partir dos resultados obtidos, algumas diferenças foram percebidas entre as amostras de bagaço de uva,

principalmente, em relação aos parâmetros fibra alimentar (solúveis e insolúveis), carboidratos (açúcares redutores em glicose e não redutores em sacarose) e minerais.

TABELA 2.2 – COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinifera* E *Vitis labrusca*)

Parâmetros	CS ¹ (<i>Vitis vinifera</i>)	ME ¹ (<i>Vitis vinifera</i>)	MI ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)	TE ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)
Umidade ²	13,63 ^a ± 0,14	6,59 ^c ± 0,21	2,85 ^d ± 0,08	8,52 ^b ± 0,15
Proteínas ²	5,32 ^c ± 0,19	13,23 ^a ± 0,71	11,58 ^b ± 0,10	13,99 ^a ± 0,09
Lipídeos totais ²	4,83 ^c ± 0,11	9,48 ^a ± 0,27	7,61 ^b ± 0,27	9,02 ^a ± 0,47
Cinzas ²	2,87 ^c ± 0,06	5,10 ^b ± 0,12	4,97 ^b ± 0,43	6,32 ^a ± 0,12
Fibra alimentar ²	26,42 ^b ± 1,30	58,99 ^a ± 0,92	56,57 ^a ± 0,48	57,73 ^a ± 0,66
Carboidratos:				
▪ Açúcares redutores ³	30,73 ^a ± 0,38	1,92 ^b ± 0,16	1,78 ^b ± 0,41	1,21 ^b ± 0,03
▪ Açúcares não redutores ⁴	20,03 ^a ± 2,07	1,54 ^b ± 0,15	1,41 ^b ± 0,35	0,90 ^b ± 0,02
Acidez titulável ⁵	0,62 ^c ± 0,10	1,28 ^b ± 0,00	2,16 ^a ± 0,31	2,17 ^a ± 0,10
Minerais:				
▪ Cálcio ⁶	112,96 ^c ± 9,63	245,36 ^b ± 14,53	245,51 ^b ± 10,42	281,43 ^a ± 3,70
▪ Ferro ⁶	49,85 ^b ± 1,70	6,91 ^c ± 0,86	9,69 ^c ± 0,73	56,76 ^a ± 3,31
▪ Manganês ⁶	19,17 ^c ± 1,25	65,58 ^a ± 2,25	15,73 ^c ± 0,97	24,35 ^b ± 0,86
▪ Fósforo ⁶	181,52 ^c ± 2,33	343,77 ^a ± 12,80	251,22 ^b ± 7,66	264,74 ^b ± 10,6
▪ Potássio ⁶	1096,5 ^c ± 15,20	1955,52 ^b ± 31,77	1881,25 ^b ± 23,36	2418,70 ^a ± 65,13

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME), Mix (MI - Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e Terci (TE). ²Resultados expressos como g 100g⁻¹ de bagaço de uva em base seca. ³Açúcares redutores: resultados expressos como g glicose 100g⁻¹ de bagaço de uva em base seca. ⁴Açúcares não redutores: resultados expressos como g sacarose 100g⁻¹ de bagaço de uva em base seca. ⁵Resultados expressos como g ácido tartárico 100 g⁻¹ de bagaço de uva em base seca. ⁶Resultados expressos como mg kg⁻¹ de bagaço de uva em base seca.

Entre as variedades ME, MI e TE não houve diferença estatística ao nível de 5% de significância e, apresentaram os maiores teores de fibra alimentar $58,99 \pm 0,92$ g 100g⁻¹, $56,57 \pm 0,48$ g 100g⁻¹ e $57,73 \pm 0,66$ g 100g⁻¹, respectivamente. Enquanto que a variedade CS teve o menor valor de fibra alimentar, $26,42 \pm 1,30$ g 100g⁻¹. A principal diferença entre os resultados deve-se ao fato das variedades ME, MI e TE conterem elevada quantidade de sementes e engaço e, minoritariamente, cascas e polpa. Já a variedade CS era composta majoritariamente por cascas e remanescente de polpa.

De acordo com Saura-Calixto (1998) e Yi et al. (2009), as fibras presentes no bagaço de uva proveniente do processo de vinificação contêm tanto compostos extraíveis quanto não extraíveis. Os compostos não extraíveis são compostos fenólicos com elevado peso molecular e potencial antioxidante. No bagaço de uva, estes compostos estão ligados às fibras e, portanto, estas tem uma melhor qualidade nutricional do que as fibras presentes nos cereais, por exemplo. Além disso, as fibras podem auxiliar no metabolismo de lipídeos reduzindo a absorção intestinal de ácidos biliares. Com isso, os resultados obtidos mostraram que as variedades ME, MI e TE podem ser promissoras fontes de fibras.

Com relação à determinação de carboidratos, foram expressos resultados com base em açúcares redutores e não redutores. Segundo Fernández-Novales et al. (2009), elevados níveis de açúcar e baixos de ácidos são indicadores de qualidade para a colheita da uva e, de acordo com Jackson (2008), em cultivares *Vitis vinífera* a concentração de açúcares pode ser de 20% ou mais, dependendo da espécie, da variedade e do estágio de maturação da fruta. Outras cultivares como *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* raramente chegam a este nível. Assim, justificam-se os maiores resultados para a variedade CS tanto para açúcares redutores em glicose ($30,73 \pm 0,38 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) quanto para açúcares não redutores em sacarose ($20,03 \pm 2,07 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) quando comparada as demais variedades (ME, MI e TE).

Os teores de minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), manganês (Mn), fósforo (P) e potássio (K) foram determinados em todas as amostras de bagaço de uva. A partir da análise estatística dos resultados, pode-se notar que a variedade TE apresentou os maiores valores para os minerais K ($2418,70 \pm 65,13 \text{ mg kg}^{-1}$), Ca ($281,43 \pm 3,70 \text{ mg kg}^{-1}$) e Fe ($56,76 \pm 3,31 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação as demais variedades. Enquanto que a variedade ME teve os maiores resultados para os minerais Mn ($65,58 \pm 2,25 \text{ mg kg}^{-1}$) e P ($343,77 \pm 12,80 \text{ mg kg}^{-1}$) com base no teste de Tukey ($P < 0,05$).

Estes minerais são considerados essenciais para a saúde humana. Por exemplo, o potássio auxilia tanto na redução da pressão sanguínea quanto no risco de doenças cardiovasculares, bem como reduz a excreção urinária do cálcio e, consequentemente, o risco de desenvolvimento de osteoporose (CETIN et al., 2011). O ferro, por sua vez, está associado a produção de células sanguíneas, entre outras funções. Enquanto que o cálcio está presente na formação óssea e na regulação de certos processos no organismo humano (SOUSA et al., 2014).

Os resultados dos parâmetros lipídeos totais, proteínas, cinzas e umidade estão em conformidade com a faixa de valores encontrados na literatura para diferentes variedades de uva e, consequentemente, bagaço de uva. Entre os estudos, temos o de Llobera e Cañellas (2007), Yi et al. (2009) e Sousa et al. (2014), que obtiveram para lipídeos totais valores entre 7,3 e $13,53 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, proteínas entre 8,49 e $12,2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, cinzas na faixa entre 4,65 e $7,58 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e umidade entre 3,33 e $10,2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. No presente trabalho, foram obtidos resultados para lipídeos entre 4,83 e $9,48 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, proteínas entre 5,32 e $13,99 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, cinzas entre 2,87 e $6,32 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e, umidade 2,85 e $13,63 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. As variações entre os valores obtidos no presente trabalho e os da literatura devem-se as diferenças entre as variedades de uva que compõem o bagaço de uva, seu estágio de maturação, condições edafoclimáticas entre outras.

2.3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Segundo Cheng et al. (2012), o tipo de solvente é um fator determinante para a eficácia do processo de extração de compostos fenólicos e existem diversos estudos que relatam a mistura de álcool etílico e água para a extração destes compostos presentes nos resíduos sólidos dos processos de vinificação. Com a aplicação simultânea de álcool etílico e água há uma melhora na eficácia do processo de extração porque a presença da água aumenta a permeabilidade do tecido celular, e assim auxilia na transferência de massa por difusão molecular, bem como na recuperação dos compostos bioativos solúveis em água. Além disso, a utilização de solventes com diferentes polaridades possibilita a extração de compostos polares (solvente aquoso) ou apolares (solvente etanólico). Desta forma, uma solução extratora hidroalcoólica é capaz de carregar tanto compostos polares quanto apolares, significando uma vantagem na extração (SALDANHA, 2005; CHAICOUSKI et al., 2014).

Com base no exposto, no processo de extração de compostos fenólicos foi utilizada a mistura dos solventes, álcool etílico e água, na concentração 40:60 (v/v), respectivamente. Os resultados do processo de extração dos compostos fenólicos totais (CFT) para os bagaços de uvas das variedades CS, ME, MI e TE podem ser observados na Figura 2.1.

O teor de CFT nos extratos apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as variedades avaliadas. A variedade MI apresentou o maior teor de CFT em base seca ($4124,46 \pm 115,01$ mg EAG 100 g^{-1} de bagaço de uva), seguido pelas variedades ME ($3107,15 \pm 175,62$ mg EAG 100 g^{-1} de bagaço de uva), CS ($2804,07 \pm 86,96$ mg EAG 100 g^{-1} de bagaço de uva) e TE ($2511,73 \pm 106,84$ mg EAG 100 g^{-1} de bagaço de uva).

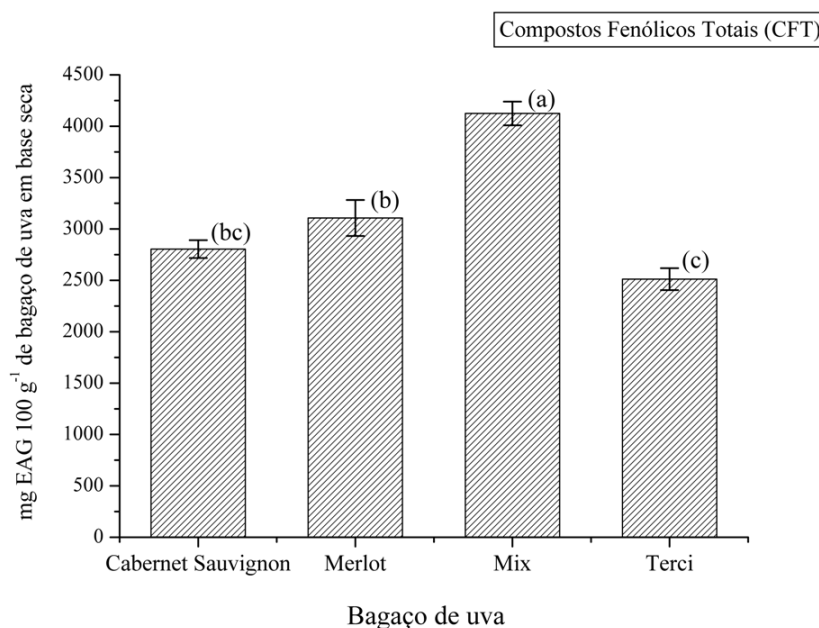


FIGURA 2.1 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE). VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)
 Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)

As diferenças entre os resultados para o teor de CFT das variedades analisadas devem-se ao processo de vinificação, pois os compostos fenólicos presentes nas partes sólidas das uvas são transferidos para o vinho ou mosto. Entretanto, fatores como a concentração destes compostos na uva, eficiência na prensagem, tempo de contato entre as partes sólidas da uva e o mosto, e a temperatura interferem neste processo de transferência, influenciando na quantidade de compostos fenólicos remanescentes no bagaço de uva.

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de compostos bioativos, do qual fazem parte outros compostos classificados em subgrupos como os flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis, entre outros), ácidos fenólicos, estilbenos e taninos. Para quantificar os flavonoides totais em frutas e vegetais, o método mais utilizado é baseado na determinação espectrofotométrica do complexo formado entre os flavonoides da matriz de análise e cloreto de alumínio (AlCl_3), reagente principal. Todavia, fatores como o tempo de reação, a concentração do reagente (cloreto de alumínio) e a estrutura química dos polifenóis presentes influenciam os resultados desta metodologia (FERNANDES et al., 2012).

No presente trabalho, foi avaliado o conteúdo total de flavonoides para todas as amostras com base no complexo formado, flavonoide- AlCl_3 . Ao analisarmos a Figura 2.2 é possível perceber que houve diferença estatística entre todas as variedades ao nível de 5 %. A variedade MI apresentou o maior conteúdo de flavonoides totais, $2157,00 \pm 10,01$ mg

ECAT.100 g⁻¹ de bagaço de uva em bs, seguida pelas variedades ME (1853,29 ± 70,56 mg ECAT.100 g⁻¹ de bagaço de uva em bs), CS (1397,26 ± 57,32 mg ECAT.100 g⁻¹ de bagaço de uva em bs) e a variedade TE, 1101,24 ± 19,64 mg ECAT.100 g⁻¹ de bagaço de uva em bs. Os resultados obtidos se justificam, pois na uva, os flavonoides estão presentes, majoritariamente, nas cascas e nas sementes e, em quantidades menores na polpa. Sendo que nas cascas, os compostos mais abundantes são os flavonóis, enquanto que as sementes são ricas em flavan-3-óis (MONTEALEGRE et al., 2006). Avaliando a composição das variedades analisadas, os maiores valores de flavonoides totais correspondem às amostras que apresentavam na sua composição elevada quantidade de cascas e sementes, enquanto que a variedade TE teve o menor resultado para flavonoides por conter engaços, predominantemente, em sua composição.

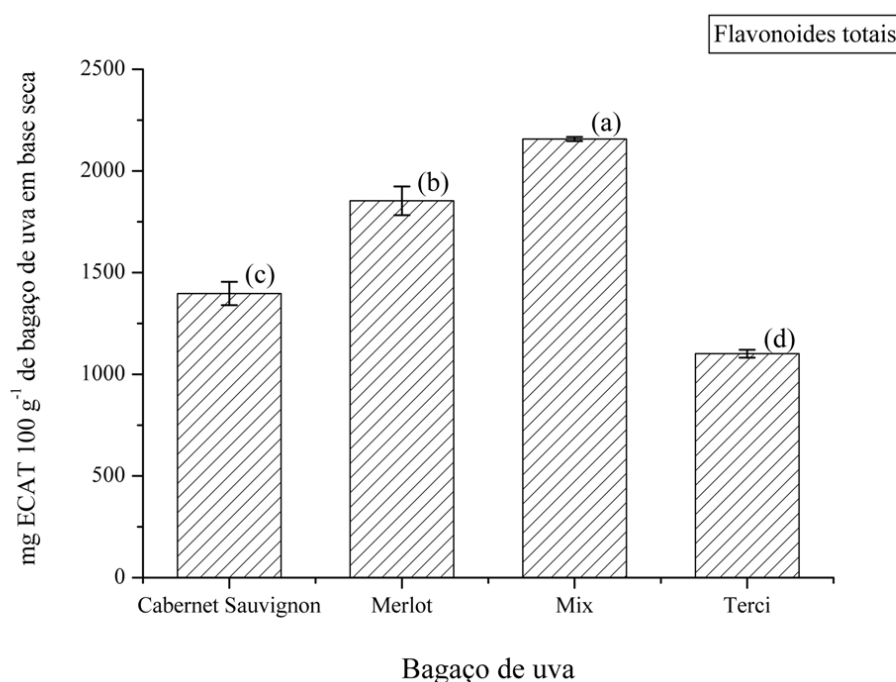


FIGURA 2.2 – TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE) VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)
Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%). ECAT: Equivalente de catequina.

Na literatura, os flavonoides são apontados como antioxidantes efetivos devido a sua habilidade de sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar metais, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica, reduzindo o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (GONZALO; ALONSO, 2002;

BABA; MALIK, 2015). Além da atividade antioxidante, os flavonoides também podem apresentar propriedades anti-inflamatória, anticancerígena e antiproliferativa (NIJVELDT et al., 2001). Em resumo, os resultados indicam que as amostras possuem teores de flavonoides relevantes, indicando o potencial de reaproveitamento do bagaço de uva.

Com relação à determinação de antocianinas totais, os resultados estão apresentados na Figura 2.3. Todas as amostras apresentaram diferença estatística ao nível de 5%. O bagaço de uva proveniente da variedade TE apresentou o maior valor de antocianinas monoméricas, $414,98 \pm 3,37$ mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo. $100g^{-1}$ de bagaço de uva em base seca, quando comparado as demais variedades. Enquanto que o bagaço da variedade ME teve o menor resultado, $75,64 \pm 11,12$ mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo. $100g^{-1}$ de bagaço de uva em base seca.

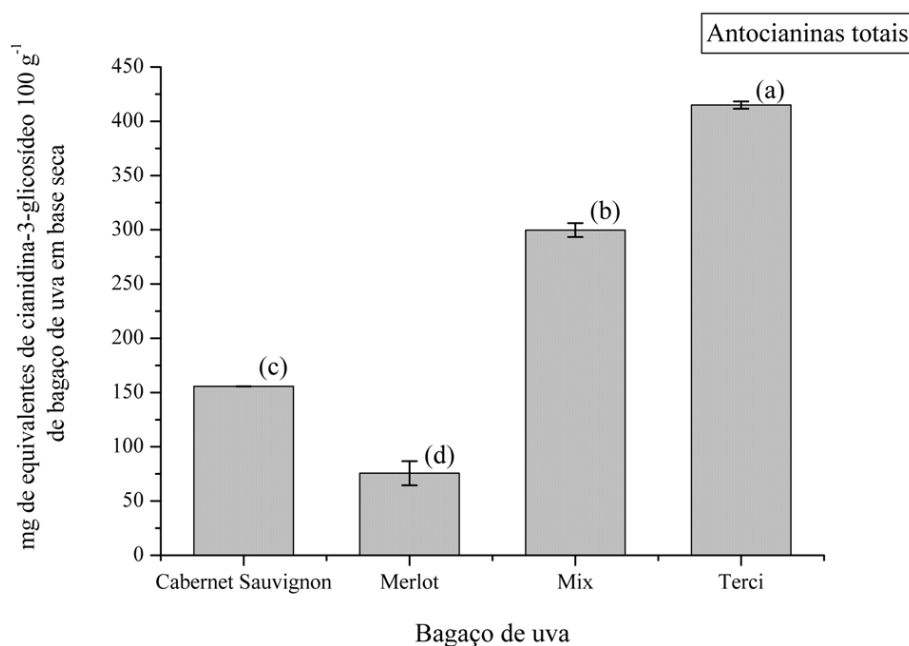


FIGURA 2.3 – TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA NA CONCENTRAÇÃO DE 40% DE ÁLCOOL ETÍLICO OBTIDOS DOS BAGAÇOS DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE) VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)
Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e são os compostos majoritários nas cascas de uvas escuras. As diferenças obtidas entre os resultados das variedades analisadas devem-se ao fato da composição de antocianinas na uva e, consequentemente no

bagaço de uva, estar ligada aos fatores genéticos da fruta, a distribuição das antocianinas na fruta durante a maturação, além dos fatores externos como as condições climáticas e características físicas e químicas do solo onde foram cultivadas (POMAR; NOVO; MASA, 2005).

2.4 CONCLUSÕES

Em termos de composição química, o bagaço de uva proveniente das variedades ME, MI e TE pode ser considerado como uma fonte de fibras (solúveis e insolúveis), enquanto que o bagaço de uva da variedade CS apresentou valores significativos de carboidratos, açúcares redutores em glicose e não redutores em sacarose. As diferenças percebidas entre os bagaços de uva são decorrentes de fatores como localização de cultivo da uva, o estágio de maturação na colheita, diferenças intrínsecas entre as espécies de uva tintas, *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca* e as diferenças nas etapas do processamento industrial do vinho. Os compostos bioativos foram determinados em todas as variedades, com valores expressivos de compostos fenólicos totais e flavonoides totais para a variedade MI, e para a variedade TE, elevada quantidade de antocianinas totais. Com base no exposto, os bagaços de uva apresentam características que indicam potencial de aproveitamento deste subproduto do setor vinícola.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*) POR DIFERENTES TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*) POR DIFERENTES TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

RESUMO

Os compostos bioativos são metabólitos secundários que apresentam benefícios para a saúde devido a sua influência sobre atividades biológicas. Entre os compostos bioativos incluem-se principalmente os compostos fenólicos. A uva contém quantidades significativas de compostos fenólicos de diferentes classes, os quais permanecem no bagaço de uva devido a sua extração incompleta durante o processamento. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar os diversos compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, os flavonoides e as antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o perfil de antociânico por CLAE acoplada a espectrometria de massas (EM), bem como descrever o perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG) presente na fração lipídica do bagaço de uva, para as variedades Cabernet Sauvignon (CS) e Merlot (ME) (*Vitis vinífera* L.), Terci (TE) e Mix (MI) (*Vitis labrusca* L.), composto pelas variedades Bordô, Isabel e BRS Violeta, cada uma nas proporções 65%, 25% e 10%, respectivamente. Entre os compostos bioativos encontrados nas variedades de bagaço de uva analisadas estão os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *trans*-cinâmico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico), flavan-3-óis (catequina), flavonóis (como quercetina, rutina e caempferol), estilbeno (resveratrol), e os ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico e ácido α -linolênico). A variedade MI teve os maiores valores para os seguintes ácidos fenólicos: ácido gálico ($397,67 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido *p*-cumárico ($209,87 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido clorogênico ($142,89 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($141,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o ácido sirínico ($343,97 \mu\text{g mL}^{-1}$) expressos em extrato de bagaço. Enquanto que a variedade ME se destacou pelos resultados relevantes de compostos de natureza distinta como para o ácido fenólico, *trans*-cinâmico ($35,36 \mu\text{g mL}^{-1}$), para os flavonóis, quercetina ($249,23 \mu\text{g mL}^{-1}$) e caempferol ($66,66 \mu\text{g mL}^{-1}$), para o estilbeno resveratrol ($36,31 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, para o ácido linoleico, 65,49 %, classificado como ácido graxo poli-insaturado. Em todas as variedades foram identificadas 13 diferentes antocianinas por CLAE-EM, com sinais mais intensos para malvidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-3-*O*-acetilglicosídeo e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo, sendo que a variedade TE apresentou o maior teor de antocianinas totais por CLAE ($409,71 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Desta forma, considerando os teores significativos dos diversos compostos bioativos encontrados no bagaço de uva, pode-se reaproveitar este resíduo devido o seu potencial funcional.

Palavras-chave: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, resíduo.

3. 1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos são metabólitos secundários de origem vegetal, também denominados como fitoquímicos ou fitonutrientes, presentes nos alimentos em pequenas quantidades, mas tem efeito positivo para a saúde devido a sua influência sobre atividades fisiológicas e celulares (BELNSTEIN, 2001; BIESALSKI et al., 2009). Entre os compostos bioativos incluem-se principalmente os compostos fenólicos.

Compostos fenólicos são substâncias de núcleo fenólico podendo conter um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, ou conter múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura, sendo chamados de compostos polifenólicos. Com base no número de anéis de fenol e na maneira pela qual esses anéis ligam-se uns aos outros, os polifenóis podem apresentar uma ampla classe de substâncias como ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, estilbenos e taninos que podem ter características lipofílicas e/ou hidrofílicas, sendo os principais componentes presentes em frutas e vegetais (MANACH et al., 2004; BARRETO, 2008).

Dependendo do tipo de planta, os compostos fenólicos podem acumular-se em todos os órgãos das plantas (raízes, caule, flores, folhas e frutos) e de formas diferentes. No caso da uva sua distribuição é desigual, entretanto, em quantidades significativas estão presentes, principalmente, os flavonoides. As sementes contêm flavanois e ácido gálico; a polpa contém ácidos hidroxicinâmicos; os vasos fibrovasculares apresentam flavanois e ácidos hidroxibenzoicos e, a casca, por sua vez, além de conter todos os compostos citados anteriormente, ainda apresenta flavonois, antocianinas e o estilbenos, no caso o resveratrol (FRANCIS, 2000; NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; YILDIRIM et al., 2005; PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007)

O bagaço da uva, por sua vez, é caracterizado pelo alto conteúdo de compostos fenólicos que permanecem após o processo de vinificação devido à extração insuficiente neste processo industrial (ARVANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006). Entre os compostos fenólicos remanescentes no bagaço de uva estão, especialmente, as antocianinas, que permanecem em grande quantidade no bagaço, visto que durante o contato das cascas da uva com o mosto na fermentação não há uma extração completa desses pigmentos. As antocianinas são pigmentos naturais com propriedades antioxidantes que atuam através da inibição da peroxidação lipídica (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; ROCKENBACH et al., 2011b).

Estudos apontam que os compostos fenólicos têm funções importantes como na modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como por seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório (HORST; LAJOLO, 2009). Além disso, atuam como bloqueadores dos radicais na reação em cadeia ou são capazes de eliminar o radical hidroxila, superóxido e oxigênio singlete (ARUOMA, 2003; ARNAO, 2000). O potencial antioxidante de um composto fenólico depende da sua estrutura, incluindo não apenas a sua polaridade, como também a natureza e a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (SOARES, 2002).

No entanto, os benefícios da uva não estão somente relacionados aos compostos fenólicos, mas também, estão associados aos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas sementes. Os ácidos graxos poli-insaturados como ácido linoleico e linolênico são essenciais para o corpo humano porque não podem ser sintetizados pelo organismo. Além disso, apresentam diversas atividades farmacológicas, como propriedades contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, prevenção de doenças cardiovasculares, redução do colesterol, dilatação dos vasos sanguíneos, entre outras (CAO; ITO, 2003; ROCKENBACH et al., 2010; LACHMAN et al., 2016).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar os compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, os flavonoides e as antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como descrever o perfil de ácidos graxos presente na fração lipídica do bagaço de quatro variedades de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*).

3. 2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS NÃO ANTOCIÂNICOS

3.2.1.1 Extração

A extração dos compostos não antociânicos como ácidos fenólicos, flavonoides e estilbenos foi realizada com base na metodologia de Jin et al. (2009) com modificações. Foram pesadas 2,5 gramas de cada bagaço de uva e colocadas em frascos de Erlenmeyer e extraídas com 5 mL de água destilada e 50 mL de acetato de etila (Carlo Erba, Itália). Os erlenmeyers contendo bagaço de uva e solvente foram submetidos à agitação em shaker (TE420, TECNAL, Brasil) a 100 rpm por 12 horas e a temperatura de 25 °C ao abrigo da luz.

Após o período de extração, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (Centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL, Fanem, Brasil) a $2794 \times g$ (4.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado e o resíduo foi re-extraído por 12 horas e, em seguida, novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram combinados, filtrados e concentrados usando um rotaevaporador a 40 °C. Em seguida, redissolvido em 5 mL de metanol (Vetec, Brasil), e finalmente filtrado em membrana PVDF de 0,22 μm , para posterior análise em CLAE-DAD.

3.2.1.2 Análise dos ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada usando o equipamento Agilent HPLC series 1200 (Agilent Technologies, Alemanha), controlado pelo software EZ Chrom Elite, com sistema automático de injeção de amostra (ALS), detector de arranjo diodos (DAD), bomba quaternária. A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse C18 (5 μm , 4,6 mm x 150 mm) preenchida com a fase estacionária de 1,8 μm do tipo C18 (Agilent, Alemanha) duplamente capeada. O DAD foi ajustado para aquisição dos dados no intervalo de 200 – 600 nm, como monitoramento simultâneo em 280, 320 e 370 nm. A fase móvel foi constituída de 2% de ácido acético em água Milli-Q (v/v) (Fase A) e 0,5% de ácido acético em água Milli-Q e acetonitrila (50:50, v/v) (Fase B). A eluição ocorreu de acordo com o seguinte gradiente: iniciando de 10 a 24% da Fase B por 20 minutos, em seguida de 24 a 30% da Fase B por 20 minutos, de 30 a 55% da Fase B por 20 minutos, de 55 a 100% da Fase B durante 15 minutos, mantida em 100% B no modo isocrático por 8 minutos, e, finalmente de 100 a 10% da Fase B por 2 minutos, mantido por mais 5 minutos para acondicionamento da coluna. O tempo total da corrida foi de 90 minutos. O volume de injeção para todas as amostras foi de 10 μL , com vazão de 0,7 mL min^{-1} conforme Kammerer et al. (2004) com modificações.

A identificação dos compostos separados por cromatografia ocorreu por meio da comparação entre os tempos de retenção dos componentes das amostras e dos padrões individuais disponíveis, da adição de uma concentração conhecida de cada padrão nas amostras e da comparação dos espectros UV-Vis ($\lambda_{\text{máx}}$) dos componentes da amostra com os espectros dos padrões.

A quantificação ocorreu utilizando curvas de calibração com os padrões correspondentes aos compostos cuja separação foi efetiva. Os padrões dos compostos fenólicos e suas respectivas concentrações foram: ácido gálico (10 a 150 mg L^{-1}), ácido

vanílico (5 a 60 mg L⁻¹), ácido sirínico (0,5 a 40 mg L⁻¹), ácido *trans*-cinâmico (5 a 50 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (1 a 75 mg L⁻¹), ácido clorogênico (5 a 25 mg L⁻¹), ácido cafeico (1 a 10 mg L⁻¹), caempferol (1 a 40 mg L⁻¹), catequina (25 a 325 mg L⁻¹), quercetina (5 a 100 mg L⁻¹), rutina (10 a 200 mg L⁻¹) e resveratrol (5 a 70 mg L⁻¹).

As curvas analíticas das soluções padrões foram construídas em triplicata com cinco concentrações diferentes, baseando-se nas faixas estimadas dos teores dos compostos nos extratos dos bagaços de uva. A linearidade do método estudado foi verificada pelos coeficientes de determinação das curvas analíticas de cada padrão analisado. Por cálculo, definiu-se o limite de detecção (LD = 3,3 SD/S) e quantificação (LQ = 10 SD/S), sendo SD o desvio padrão do branco e S a inclinação da curva analítica, confirmados pela injeção de soluções preparadas nos valores calculados.

3.2.2 ANÁLISE DE COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS

3.2.2.1 Extração

A extração dos compostos antociânicos foi realizada com base na metodologia de Kammerer et al. (2004) com modificações. Aproximadamente, foi pesado 1,0 g de cada bagaço de uva e colocada em frascos de Erlenmeyer e extraídas com 25 mL de metanol/HCl 0,1% (v/v). Os erlenmeyers contendo bagaço de uva e solvente foram submetidos à agitação em shaker (TE420, TECNAL, Brasil) a 100 rpm por 10 horas e a temperatura de 25 °C ao abrigo da luz. Após o período de extração, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (Centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL, Fanem, Brasil) a 2794 × g (4.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado e o resíduo foi re-extraído por 14 horas e, em seguida, novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram combinados, filtrados e concentrados usando um rotaevaporador a temperatura de 30 °C. Em seguida, o resíduo foi redissolvido em 20 mL de uma solução contendo água acidificada (pH =3.0) e metanol (50:50, v/v) e, finalmente, 1 mL desta solução foi filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm, para posterior análise em CLAE-DAD e CLAE-EM/EM.

3.2.2.2 Análise de antocianinas por CLAE-DAD e CLAE-EM

A análise do perfil de antocianinas nas amostras de bagaço de uva foi realizada por cromatografia líquida em dois equipamentos distintos, um para a identificação usando o espectrômetro de massas (EM) e outro para quantificação usando o detector DAD.

Para a identificação das antocianinas foi usado o cromatógrafo Agilent 1200 HPLC (Santa Clara, EUA) equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B acoplado a um espectrômetro de massas Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems MDS Sciex, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, E.U.A.) e uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna XBridge C8 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) mantida a temperatura de 25 °C.

Os dados foram processados pelo software Analyst 1.4 (MDS Sciex, Canadá). Nitrogênio com elevada pureza foi produzido usando o gerador PEAK Scientific Instruments (Chicago, E.U.A.). Os parâmetros da fonte de ionização utilizados no modo positivo foram: gás de interface (CUR) 10 psi, gás de colisão (CAD) 6 psi, gás de nebulização (GS1) 45 psi, gás turbo (GS2) 40 psi, voltagem do íon spray (IS) 5500 V e temperatura 500 °C. As análises foram realizadas no modo de operação Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), mantendo o período de tempo para varredura de cada íon-precursor e seus fragmentos (*dwell time*) em 300 ms.

Os parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto foram energia de colisão (CE) 25 volts, potencial de entrada na cela de colisão (CEP) 20 volts, potencial de saída da cela de colisão (CXP) 3750 volts, potencial de desagrupamento (DP) 40 volts e potencial de entrada (EP) 10 volts. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1, GS2 e CAD foi produzido por um gerador de nitrogênio da *Peak Scientific Instruments* (Chicago, IL, EUA).

Para a quantificação das antocianinas foi usado o equipamento Agilent HPLC series 1200 (Agilent Technologies, Alemanha), controlado pelo software EZ Chrom Elite, com sistema automático de injeção de amostra (ALS), detector de arranjo diodos (DAD), bomba quaternária. A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse XDB C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). O monitoramento foi a 520 nm. Os resultados foram expressos em base cianidina-3-glicosídeo (Sigma-Aldrich Chemical Co., E.U.A.) usada para curva padrão, conforme metodologia proposta por Nielsen (2003).

Tanto para identificação por CLAE-EM quanto para a quantificação por CLAE-DAD, as fases para eluição foram compostas pela fase A, água Milli-Q/ácido fórmico/acetonitrila (95:2:3, v/v/v) e pela fase B, água Milli-Q/ácido fórmico/acetonitrila

(48:2:50, v/v/v), as quais foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: iniciando de 10 a 25% da Fase B por 10 minutos, em seguida de 25 a 31% da Fase B por 5 minutos, de 31 a 40% da Fase B por 5 minutos, de 40 a 50% da Fase B durante 10 minutos, de 50 a 100% da Fase B por 10 minutos, de 100 a 10% da Fase B por 5 minutos, mantidos por mais 5 minutos para acondicionamento da coluna, conforme Kammerer et al. (2004) com modificações. O tempo total da corrida foi de 50 minutos. O volume de injeção para todas as amostras foi de 10 μL , com vazão de 0,8 mL min^{-1} . Todas as fases móveis foram filtradas em membranas PTFE de 0,45 μm (Millipore, França) antes das análises.

3.2.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos totais foram extraídos por extração a quente, pela mistura de 3 gramas de cada amostra de bagaço de uva com éter etílico P.A. (Synth, Brasil) usando o extrator de Soxhlet (Prodicil, Brasil) durante 5 horas (AOCS, 2004). Os ácidos graxos totais foram extraídos e convertidos em ésteres metílicos por catálise básica usando hidróxido de sódio em metanol (ISO, 1978). Desta forma, 1,0 g do óleo extraído foi dissolvido em 10 mL de *n*-hexano (Mallinckrodt Chemicals, E.U.A.). Em seguida, 0,5 mL da solução de NaOH (Dinâmica, Brasil) em metanol (Vetec, Brasil) (2,0 mol L^{-1}) foi adicionada e agitou-se a solução por 20 segundos. A solução foi decantada e o sobrenadante foi coletado, filtrado em membrana PVDF de 0,22 μm , para posterior análise em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC).

Ésteres metílicos de ácidos graxos foram submetidos à análise em Cromatógrafo a gás GC 14B (Shimadzu, Japão), equipado com coluna capilar DB-23 (J&W Scientific, Agilent Technologies, E.U.A.) com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura. Todos os parâmetros cromatográficos foram determinados durante o estudo. As temperaturas do injetor, da e do detector foram de 235 e 260 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio (N_2), com vazão de 0,71 mL min^{-1} e pressão de 200 kPa. O volume de injeção foi de 1,0 μL para ésteres metílicos com razão de *split* de 1:70. A rampa de temperatura da coluna ocorreu com aquecimento a 140 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, com aumento a 4 $^{\circ}\text{C/minuto}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$, sendo mantida esta temperatura por 10 minutos. Em seguida houve o aumento até 220 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C/minuto}$, esta temperatura permaneceu por 10 minutos, com aumento a 3 $^{\circ}\text{C/minuto}$ para 235 $^{\circ}\text{C}$, sendo mantida nesta temperatura por 2 minutos. O tempo total da análise foi de 50 minutos.

O perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizado por normalização de área, em que os percentuais dos ácidos graxos foram determinados com base na área relativa de cada pico, em função da área total dos picos identificados. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram comparados com os tempos de retenção dos padrões F.A.M.E. Mix C14 – C22 e F.A.M.E. Mix RM – 3 (SUPELCO, Bellefonte, E.U.A.) com grau de pureza $\geq 99,9\%$.

3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

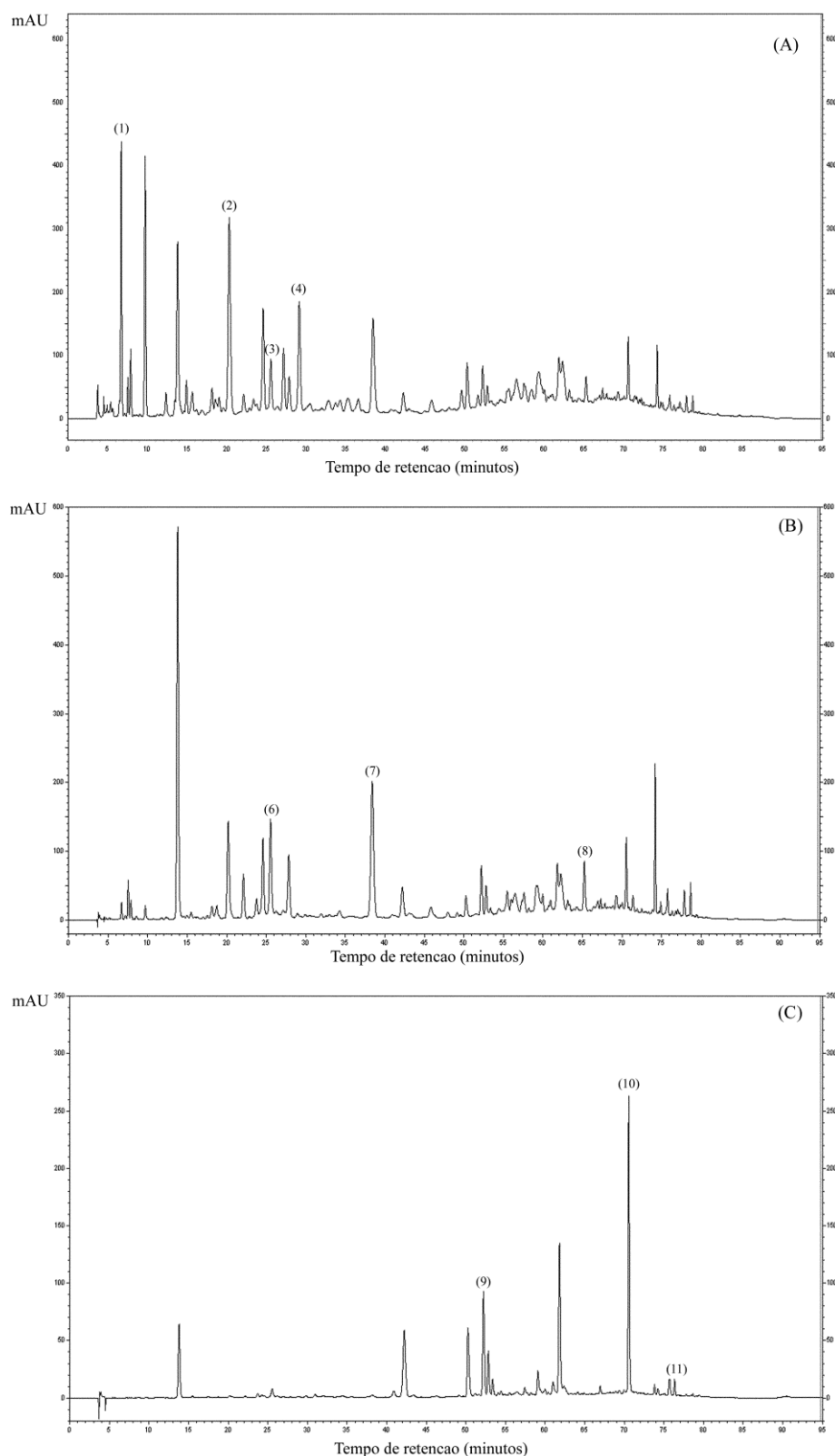
Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância com $p \leq 0,05$. As diferenças significativas entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância. O software Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) foi utilizado para as análises.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os compostos bioativos analisados por cromatografia estão os compostos fenólicos não antociânicos (ácidos fenólicos, flavan-3-óis, flavonóis, estilbenos) e antociânicos que foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e por CLAE acoplada a espectrometria de Massas (EM), e os ácidos graxos, por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).

3.3.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS NÃO ANTOCIÂNICOS

Entre os compostos fenólicos não antociânicos encontrados nas variedades de bagaço de uva estão os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *trans*-cinâmico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico), flavan-3-óis (catequina), flavonóis (como quercetina, rutina e caempferol) e estilbeno (resveratrol), os quais podem ser observados na Figura 3.1.



A partir dos compostos identificados nos cromatogramas da Figura 3.1, foram realizadas as etapas de quantificação com base em uma curva de calibração em separado para cada composto específico.

Apesar de ter sido apresentado apenas cromatogramas da variedade MI, as demais amostras CS, ME e TE também tinham em sua composição os mesmos ácidos fenólicos e flavonoides, com variações estatísticas ao nível de 5%, segundo o teste de Tukey, na sua quantificação. Além disso, podem ser visualizados nos cromatogramas que há vários compostos presentes no bagaço de uva, entretanto, não foram identificados e quantificados.

Segundo Pinelo, Arnous e Meyers (2006) em seu trabalho de revisão enumeram vários estudos que apontam os principais compostos fenólicos que estão presentes tanto em diferentes frações da uva como também no bagaço de uva. Especificamente no bagaço de uva foram encontrados os ácidos gálico, caftarico e coumarico em termos de ácidos fenólicos. Catequina, epicatequina e suas variações foram citadas nos estudos e fazem parte da classe dos flavan-3-óis e, no caso dos flavonóis, miricetina, quercetina, rutina e caempferol foram os principais compostos que a literatura aponta. Alguns dos compostos citados foram identificados e quantificados neste estudo e, vários outros, como pode ser observado na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE DIFERENTES EXTRATOS DE BAGAÇOS DE UVA ANALISADOS POR CLAE-DAD

Compostos	Bandas (nm)	t _R (min.)	Equação de regressão	R ²	LD (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)	CS (µg mL ⁻¹)	ME (µg mL ⁻¹)	MI (µg mL ⁻¹)	TE (µg mL ⁻¹)
<i>Ácidos</i>										
<i>hidroxibenzoicos</i>										
Ácido gálico	280	6,7	y = 112393x - 60428	0,9998	1,77	5,36	225,35 ^c ± 3,40	291,23 ^b ± 14,84	397,67 ^a ± 1,18	186,18 ^d ± 3,53
Ácido vanílico	280	25,5	y = 83720x - 1651,1	0,9986	0,06	0,20	279,70 ^b ± 4,69	283,30 ^b ± 16,64	284,09 ^b ± 0,66	332,38 ^a ± 31,76
Ácido sirínigico	280	29,1	y = 125473x + 42799	0,9995	1,12	3,41	345,55 ^a ± 5,53	368,73 ^a ± 17,86	343,97 ^a ± 0,91	219,15 ^b ± 26,84
<i>Ácidos</i>										
<i>hidroxicinâmicos</i>										
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	280	72,3	y = 353295x - 203470	0,9993	1,90	5,76	n.d.	35,36 ^a ± 2,23	n.d.	36,20 ^a ± 1,63
Ácido cafeico	320	26,5	y = 245229x - 84277	0,9998	1,13	3,43	111,31 ^b ± 2,30	30,43 ^c ± 6,24	141,52 ^a ± 2,10	n.d.
Ácido clorogênico	320	22,1	y = 121088x - 35161	0,9986	0,96	2,90	n.d.	n.d.	142,89 ^a ± 4,65	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumárico	320	38,4	y = 300525x - 100369	0,9999	1,10	3,34	**	11,74 ^c ± 0,41	209,87 ^a ± 2,47	61,83 ^b ± 18,78
<i>Flavan-3-óis</i>										
Catequina	280	20,3	y = 26769x - 84317	0,9996	10,76	32,62	160,44 ^b ± 2,40	153,04 ^b ± 6,47	275,09 ^a ± 0,37	153,88 ^b ± 13,05
<i>Flavonois</i>										
Quercetina	370	70,8	y = 196238x - 237559	0,9999	3,99	12,10	23,81 ^d ± 0,65	249,23 ^a ± 1,14	159,60 ^b ± 1,04	101,89 ^c ± 0,20
Rutina	370	52,8	y = 56165x - 11294	0,9988	0,66	2,01	216,96 ^a ± 0,17	33,59 ^c ± 4,01	112,96 ^b ± 1,49	113,13 ^b ± 0,52
Caempferol	370	76,3	y = 164186x - 68114	0,9959	4,06	12,31	**	66,66 ^a ± 1,71	**	**
<i>Estilbenos</i>										
Resveratrol	320	67,3	y = 345918x - 21443	0,9998	0,20	0,62	3,84 ^d ± 0,13	36,31 ^a ± 1,13	15,30 ^c ± 0,21	21,77 ^b ± 1,13

Note: CS (Cabernet Sauvignon - *Vitis vinifera*), ME (Merlot - *Vitis vinifera*), MI – (Míx - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e TE (Terci - *Vitis labrusca*). LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; n.d. = não detectado ou valores menores que LD.**Valores entre LD e LQ. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes entre as amostras na mesma linha apresentam diferença estatística entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

Os ácidos fenólicos apresentam diferentes estruturas moleculares, sendo divididos em dois grandes grupos: os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Neste estudo, entre os ácidos hidroxibenzoicos foram detectados e quantificados o ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico em 280 nm em todas as variedades CS, ME, MI e TE. A variedade MI teve o maior valor para o ácido gálico ($397,67 \pm 1,18 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que entre as variedades CS, ME e MI, não houve diferença estatística ao nível de 5%, em relação a quantidade de ácido sirínico presente, as quais tiveram os seguintes valores $345,55 \pm 5,53$, $368,73 \pm 17,86$ e $343,97 \pm 0,91 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já o ácido vanílico se destacou na variedade TE, com $332,38 \pm 31,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com a Tabela 3.1. Estes ácidos hidroxibenzoicos são compostos bioativos importantes que têm propriedades antimicrobianas e biológicas, e que têm sido detectados em sementes de uva, segundo a literatura.

No caso dos ácidos hidroxicinâmicos foram detectados e quantificados os ácidos *trans*-cinâmico, cafeico, clorogênico e *p*-cumárico em 280 e 320 nm. Entretanto, na variedade CS foi quantificado apenas o ácido cafeico ($111,31 \pm 2,30 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto que os ácidos *p*-cumárico ($209,87 \pm 2,47 \mu\text{g mL}^{-1}$), clorogênico ($142,89 \pm 4,65 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o cafeico ($141,52 \pm 2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram majoritários na variedade MI. O ácido *trans*-cinâmico foi determinado apenas nas variedades ME ($35,36 \pm 2,23 \mu\text{g mL}^{-1}$) e TE ($36,20 \pm 1,62 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que não houve, entre estas variedades, diferença estatística ao nível de 5% de acordo com o teste de Tukey. Os ácidos fenólicos têm sido amplamente estudados, devido suas atividades bioativas, as quais incluem potencial antioxidante, atividades anti-inflamatórias, antialérgicas e auxiliam na prevenção de artrite (JAKOBEK et al., 2007; HELENO et al., 2015).

Os flavan-3-óis são uma das principais classes de compostos fenólicos presentes tanto na casca quanto nas sementes de uvas e, por consequência, no bagaço de uva. A catequina é o principal representante dos flavan-3-óis. A partir dos dados da Tabela 3.1, percebeu-se que a variedade MI se destacou em relação as demais variedades estudadas, quanto ao teor de catequina, com $275,09 \pm 0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, os flavonóis também são considerados compostos fenólicos importantes e ficam localizados nas cascas das uvas. Entre os principais flavonóis estão a quercetina, a rutina, o caempferol, a miricetina e seus derivados glicosilados (MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; YU; AHMEDNA, 2013).

A variedade CS apresentou o maior teor de rutina ($216,96 \pm 0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$), em relação as demais variedades. Enquanto que para a variedade ME os flavonóis preponderantes foram quercetina ($249,23 \pm 1,14 \mu\text{g mL}^{-1}$) e caempferol ($66,66 \pm 1,71 \mu\text{g mL}^{-1}$), este último foi quantificado apenas nesta variedade. O perfil de flavonóis depende da variedade da uva,

mas em geral, quercetina e seus derivados glicosilados são os compostos predominantes. As atividades biológicas dos flavonóis dependem fortemente de vários fatores tais como o grau de glicosilação e o tipo de açúcar residual (GEORGIEV, ANANGA, TSOLOVA, 2014).

Em relação aos estilbenos, sabe-se que a casca da uva é uma fonte rica de resveratrol, portanto, a presença deste composto era esperada, porque todas as amostras de bagaço de uva continham quantidade elevada de casca, além de sementes e engaços. Desta forma, foi possível detectar a presença de resveratrol em todas as amostras avaliadas, com maior valor para variedade ME, $36,31 \pm 1,13 \mu\text{g mL}^{-1}$. A presença do resveratrol em quantidades significativas é importante porque ele é um potente antioxidante, anti-inflamatório e uma substância cardioprotetora (AZIZ; KUMAR; AHMAD, 2003).

Alguns dos compostos bioativos não antociânicos determinados neste estudo para as variedades CS, ME, MI e TE, também foram relatados por Yilmaz e Toledo (2004) que confirmaram a presença de ácido gálico, catequina e resveratrol quando estudaram bagaço de uva das variedades Merlot e Chardonnay. Assim como Montealegre et al. (2006), que obtiveram catequina, quercetina e caempferol em bagaços de uvas das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Shiraz. Rockenbach et al. (2011a) em sua pesquisa com 8 diferentes bagaços de uva, obtiveram não somente rutina, quercetina, caempferol, catequina, resveratrol e ácido gálico como os demais autores citados, mas também ácido clorogênico. Os trabalhos citados corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

3.3.2 ANÁLISE DE COMPOSTOS ANTOCIÂNICOS

Os compostos antociânicos foram identificados por CLAE – EM/EM. A Figura 3.2 mostra o perfil de antocianinas presentes na variedade CS. No entanto, as amostras, ME, MI e TE, também apresentaram perfil cromatográfico similar. As antocianinas identificadas neste estudo tiveram sinais mais intensos para malvidina-3-*O*-glicosídeo (pico 5), malvidina-3-*O*-acetilglicosídeo (pico 9) e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo (pico 13).

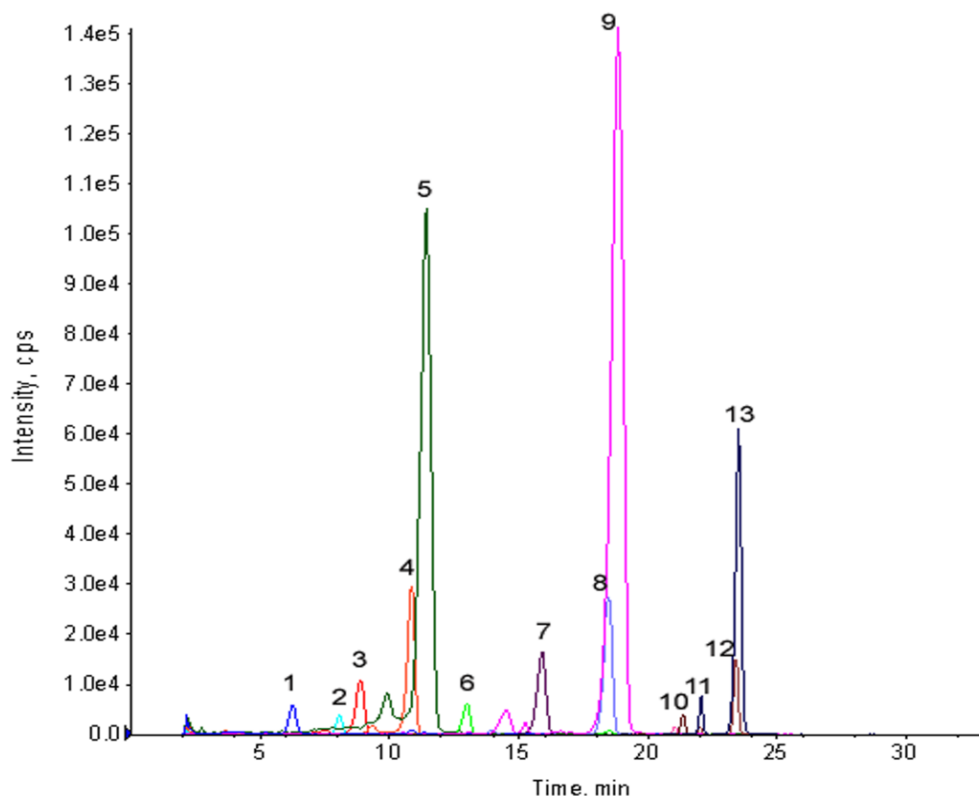


FIGURA 3.2 – CROMATOGRAMA DO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM/EM).

Nota: (CS). Compostos: (1) Delfinidina 3-*O*-glicosídeo; (2) Cianidina 3-*O*-glicosídeo; (3) Petunidina 3-*O*-glicosídeo; (4) Peonidina-3-*O*-glicosídeo; (5) Malvidina-3-*O*-glicosídeo; (6) Delfinidina-3-*O*-acetilglicosídeo; (7) Petunidina-3-*O*-acetilglicosídeo; (8) Peonidina-3-*O*-acetilglicosídeo; (9) Malvidina-3-*O*-acetilglicosídeo, (10) Cianidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo; (11) Petunidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo; (12) Peonidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo; (13) Malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo. Todas as amostras de bagaço de uva - ME (Merlot - *Vitis vinifera*), MI – (Mix - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS violeta (10%)) e TE (Terci - *Vitis labrusca*) tiveram comportamento cromatográfico similar.

A identificação das antocianinas ocorreu via análise de espectrometria de massas considerando os fragmentos gerados e os dados da literatura (KAMMERER et al., 2004). Na Tabela 3.2 há um resumo dos resultados com base nas 13 antocianinas encontradas em todas as amostras de bagaço de uva, bem como o tempo de retenção de cada uma, a relação massa por carga, a perda de massa e os fragmentos obtidos pela dissociação induzida por colisão no experimento MS².

TABELA 3.2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANTOCIANINAS PRESENTES EM DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

Nº.	Compostos	Tempo de retenção (min.)	[M] ⁺ m/z	Perda de massa (M+H ⁺)-MS ²	MS/MS fragmentos m/z
1	Delfinidina 3-O-glicosídeo	6,2	465	-162	303
2	Cianidina 3-O-glicosídeo	8,1	449	-162	287
3	Petunidina 3-O-glicosídeo	8,9	479	-162	317
4	Peonidina 3-O-glicosídeo	10,8	463	-162	301
5	Malvidina 3-O-glicosídeo	11,4	493	-162	331
6	Delfinidina 3-O-acetilglicosídeo	13,0	507	-204	303
7	Petunidina 3-O- acetilglicosídeo	15,9	521	-204	317
8	Peonidina 3-O- acetilglicosídeo	18,5	505	-204	301
9	Malvidina 3-O- acetilglicosídeo	18,8	535	-204	331
10	Cianidina 3-O-p-cumarilglicosídeo	21,0	595	-308	287
11	Petunidina 3-O-p- cumarilglicosídeo	21,4	625	-308	317
12	Peonidina 3-O-p- cumarilglicosídeo	23,4	609	-308	301
13	Malvidina 3-O-p- cumarilglicosídeo	23,5	639	-308	331

Nota: antocianinas presentes em todas as amostras de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinífera*), Merlot (*Vitis vinífera*), MI (Mix - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e Tercei (*Vitis labrusca*)

Segundo Van Bramer (1998), na identificação de compostos com base na ionização por spray de elétrons ocorrem sucessivas clivagens resultando em um espectro de massas contendo apenas fragmentos iônicos, formados a partir da molécula original. Como as antocianinas apresentam carga positiva natural [M]⁺, o modo positivo foi escolhido para a análise. Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula, e de seus respectivos fragmentos, é possível inferir sua composição química elementar e, com isso, determinar sua estrutura.

A ionização em modo positivo gerou um íon molecular principal de m/z 465, correspondente à molécula de delfinidina-3-glicosídeo, antocianina mais polar em relação às demais e, portanto a primeira a ser eluída, com seu fragmento em m/z 303. Este fragmento se referente à molécula de delfinidina aglicona, gerada pela perda de 162 unidades de massa correspondente a um glicosídeo, sem uma unidade de água. De acordo com Souza (2008), no caso de hexoses, a massa molecular é de 180 Da, mas na clivagem da molécula de açúcar há a remoção de uma unidade de água, assim, essas moléculas passam a ter massa de 162 Da.

Em seguida, foram eluídas as seguintes antocianinas: cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, como pode ser observado na Figura 3.2 e na Tabela 3.2.

Com relação aos acetilglicosídeos de massa 204 Da, foram detectados quatro derivados (picos 6–9) ligados a delfinidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina, respectivamente. De acordo com Baldi et al. (1995), as antocianinas peonidina 3-O-

acetilglicosídeo e malvidina 3-*O*- acetilglicosídeo são comumente encontradas em uvas e vinhos e, pertencem ao grupo das 9 antocianinas que caracterizam a identidade de uma variedade de uva ou vinho. Além disso, Beneytez, Cabello e Revilla (2003) afirmam que as antocianinas delfinidina 3-*O*-acetilglicosídeo e cianidina 3-*O*-acetilglicosídeo são encontradas principalmente em uvas como Cabernet Sauvignon e Merlot. Já os derivados *p*-cumarilglicosídeos (picos 10 – 13) de massa molecular, 308 Da, foram identificados ligados a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina, respectivamente (Tabela 3.2).

De acordo com Beneytez, Cabello e Revilla (2003) em seu estudo sobre antocianinas em uvas e vinhos tintos por CLAE-EM foram identificadas 20 diferentes antocianinas, divididas em quatro grupos: 5 antocianidinas ligadas ao grupamento monoglicosídeo, 5 ligadas ao grupamento acetilglicosídeo, 9 ligadas ao grupamento *p*-cumarilglicosídeo e apenas 1 antocianidina ligada ao grupo cafeoilglicosídeo. Das 20 antocianinas identificadas por esses autores, 13 são similares as encontradas nos bagaços de uva das variedades CS, ME, MI e TE estudadas neste trabalho.

Os estudos de Kammerer et al. (2004) e Wu e Prior (2005) corroboraram com os resultados deste trabalho, pois esses autores identificaram em seus estudos a presença de diferentes antocianinas em uva e bagaço de uva, as quais foram divididas em antocianinas com moléculas glicosídicas, antocianinas com grupo acetil e antocianinas com grupo cumaril.

A Figura 3.3 mostra os resultados dos espectros de fragmentação de massas do bagaço de uva para a variedade CS e aponta a presença de 4 antocianinas, a delfinidina-3-*o*-glicosídeo; a delfinidina-3-*o*-acetilglicosídeo, a cianidina-3-*o*-glicosídeo e a cianidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo. Enquanto que na Figura 3.4 podem ser visualizados os espectros de outras 9 antocianinas, petunidina-3-*o*-glicosídeo, petunidina-3-*o*-acetilglicosídeo, petunidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo, peonidina-3-*o*-glicosídeo, peonidina-3-*o*-acetilglicosídeo, peonidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo, malvidina-3-*o*-glicosídeo, malvidina-3-*o*-acetilglicosídeo e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo, todas presentes também na variedade CS.

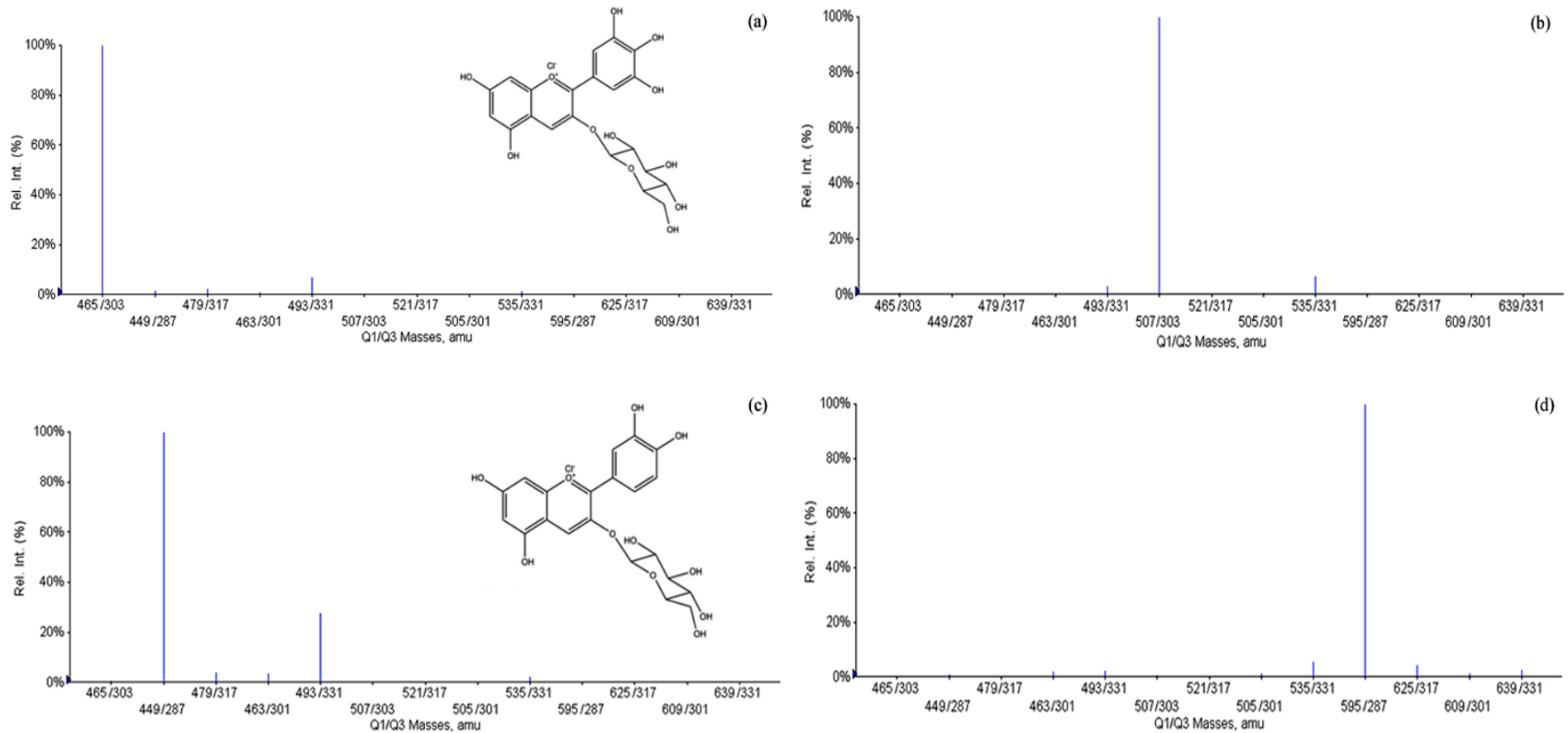


FIGURA 3.3 – ESPECTRO DE MASSAS DE QUATRO ANTOCIANINAS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON (CS)

Nota: Compostos: (a) delfinidina-3-*o*-glicosídeo; (b) delfinidina-3-*o*-acetilglicosídeo; (c) cianidina-3-*o*-glicosídeo; (d) cianidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo. Todas as amostras de bagaço de uva - CS (Cabernet Sauvignon - *Vitis vinífera*), ME (Merlot - *Vitis vinífera*), MI – (Mix - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e TE (Terci - *Vitis labrusca*) apresentaram espectro similar.

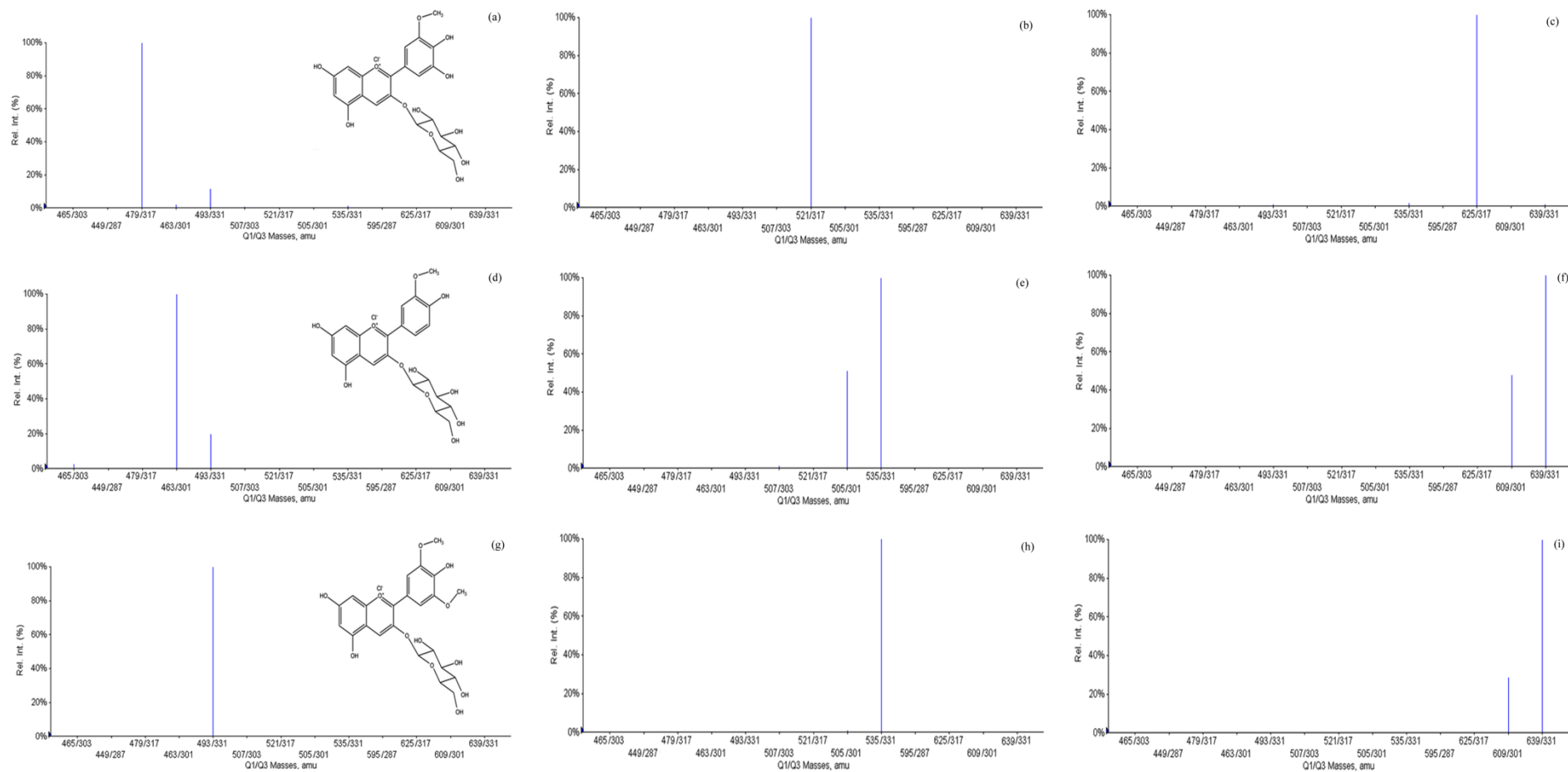


FIGURA 3.4 – ESPECTRO DE MASSAS DE NOVE ANTOCIANINAS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE CABERNET SAUVIGNON (CS).

Nota: Compostos: (a) petunidina-3-*o*-glicosídeo; (b) petunidina-3-*o*-acetilglicosídeo (c) petunidina-3-*O-p*-cumarilglicosídeo; (d) peonidina-3-*o*-glicosídeo; (e) peonidina-3-*o*-acetilglicosídeo; (f) peonidina-3-*O-p*-cumarilglicosídeo; (g) malvidina-3-*o*-glicosídeo; (h) malvidina-3-*o*-acetilglicosídeo; (i) malvidina-3-*O-p*-cumarilglicosídeo. Todas as amostras de bagaço de uva - CS (Cabernet Sauvignon - *Vitis vinifera*), ME (Merlot - *Vitis vinifera*), MI – (Mix - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e TE (Terci - *Vitis labrusca*) apresentaram espectro similar.

Para realizar a quantificação das antocianinas, todas as amostras foram analisadas por CLAE-DAD. Os resultados para os bagaços de uva das variedades CS, ME, MI e TE foram obtidos com base no total de antocianinas detectadas a 520 nm.

Na Figura 3.5 podem ser visualizados os resultados expressos tanto no extrato analisado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) quanto no seu correspondente em massa ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Todos os valores foram obtidos a partir de uma curva de calibração tendo como padrão a cianidina (NIELSEN, 2003).

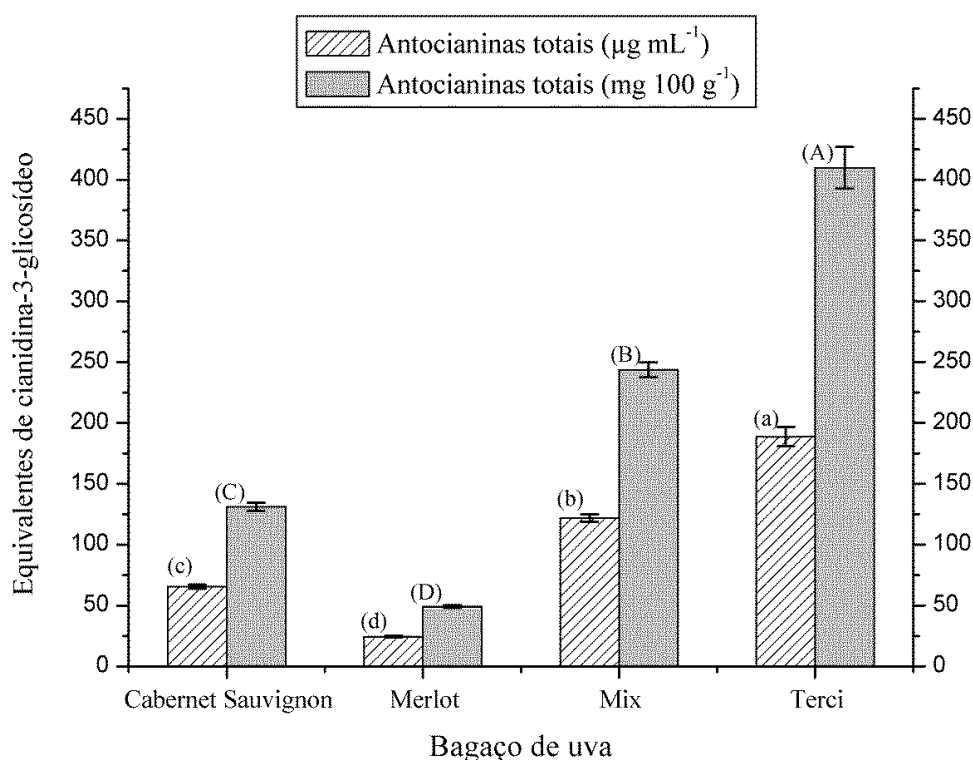


FIGURA 3.5 – TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE)

Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes em cada coluna apresentam diferença estatística entre si (teste de tukey, $p<0,05$) para o teor de antocianinas totais expressos em massa/massa. Letras minúsculas diferentes em cada coluna apresentam diferença estatística entre si (teste de tukey, $p<0,05$) para o teor de antocianinas totais expressos em massa/volume.

Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%).

Os dados obtidos mostraram diferenças nas concentrações de antocianinas totais para todas as variedades estudadas. Com destaque para a variedade TE que apresentou o maior teor de antocianinas ($188,77 \pm 7,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalentes de cianidina-3-glicosídeo), seguida pela variedade MI ($121,90 \pm 3,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CS ($65,50 \pm 1,67 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ME ($24,52 \pm 0,57$).

Os resultados obtidos por CLAE-DAD expressos em massa por volume ($\mu\text{g mL}^{-1}$) quando convertidos para relação massa por massa ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) apresentaram semelhança com os resultados de antocianinas totais determinadas pelo métodos de pH diferencial por espectrofotometria UV-Vis, descritas no Capítulo 2, item 2.3.2.

Ao comparar os resultados entre as duas metodologias, CLAE-DAD e UV-Vis, pode-se verificar que não houve diferença estatística para as variedades CS, ME e TE ao nível de 5%, apesar da forma de extração, metodologia e equipamentos de análise serem diferentes. A variedade TE apresentou o maior teor de antocianinas totais por CLAE-DAD ($409,71 \pm 17,13 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) assim como por UV-Vis ($414,95 \pm 3,37 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e a variedade ME teve os menores resultados tanto para CLAE-DAD ($49,04 \pm 1,15 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) quanto por UV-Vis ($75,64 \pm 11,12 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005) durante a maturação das uvas, ocorre a síntese e degradação de alguns pigmentos. Nas variedades tintas, destaca-se a síntese de antocianinas, que são pigmentos de coloração variável do vermelho ao azul. Assim, as diferenças entre os teores de antocianinas encontrados justificam-se pelas diversas alterações durante a síntese destes compostos, bem como a interferência de outros fatores como a variedade e as condições climáticas, por exemplo. Apesar disso, o perfil das antocianinas identificadas e quantificadas neste estudo indica que todas as amostras de bagaço de uva utilizadas neste estudo podem ser fonte destes compostos, sendo de interesse para a indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica.

3.3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O conteúdo total de lipídeos entre as amostras variou de 4,83 a 9,48 $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$. Esta variação depende não somente da variedade de uva, mas também da eficiência do processo industrial na separação de cascas, engaço e sementes e, por consequência, da quantidade de sementes presentes no bagaço de uva. A partir das extrações de lipídeos totais, foi obtido o perfil de ácidos graxos para cada amostra de bagaço de uva.

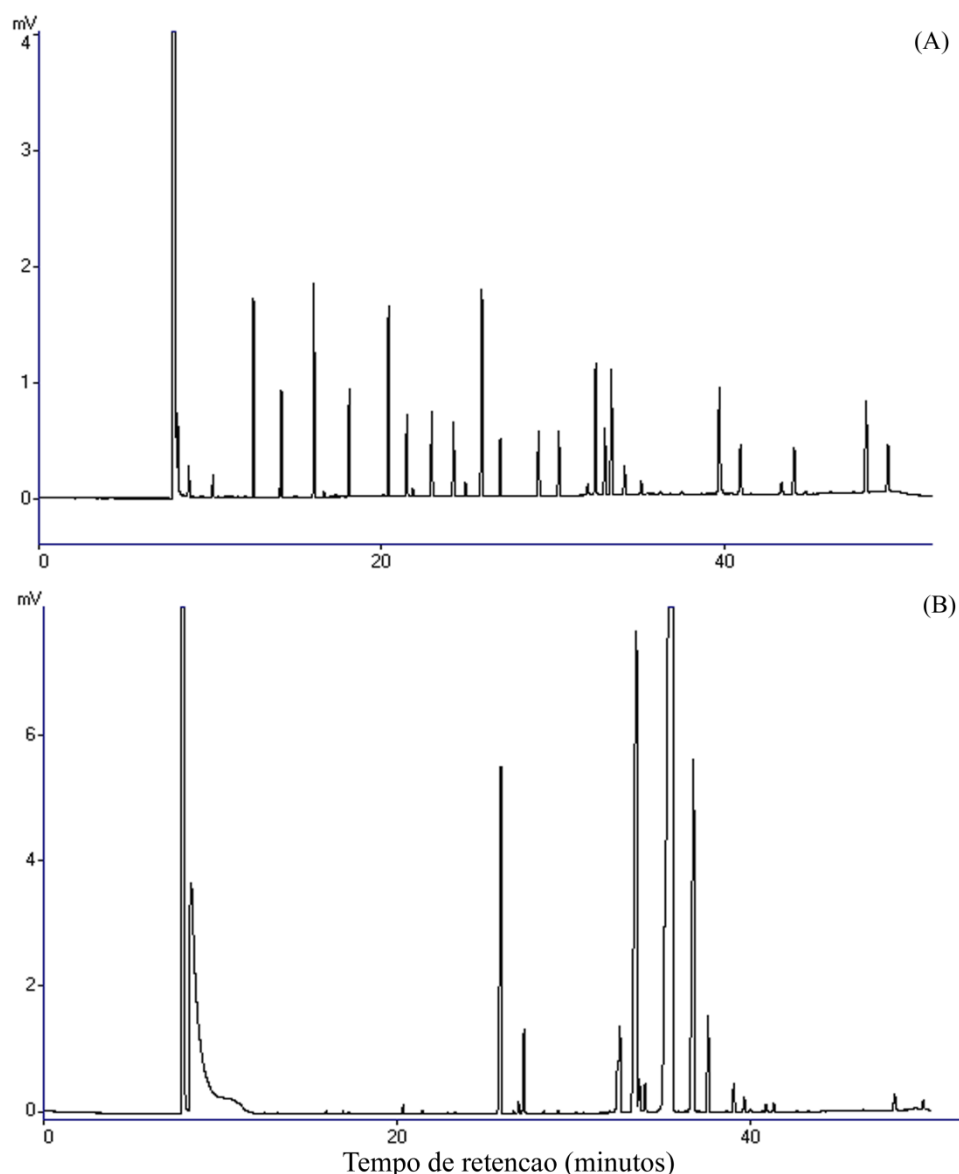


FIGURA 3.6 – CROMATOGRAMA DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA DA VARIEDADE MERLOT OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC).

Nota: (A) Perfil da mistura contendo 37 padrões de ácidos graxos; (B) Perfil para a amostra ME. Todas as amostras de bagaço de uva - CS (Cabernet Sauvignon - *Vitis vinífera*), MI – (Mix - *Vitis labrusca* - composição: Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS violeta (10%)) e TE (Terci - *Vitis labrusca*) apresentaram os mesmos compostos em seus respectivos cromatogramas.

Na Figura 3.6 (A), pode-se visualizar o perfil dos 37 padrões de ácidos graxos utilizados para identificar os compostos nas amostras. E, na Figura 3.6 (B) os ácidos graxos no bagaço de uva da variedade ME, como exemplo. As análises por cromatografia permitiram detectar vários ácidos graxos incluindo ácidos graxos saturados (AGS) (9,62 – 11,52% do total de ácidos graxos), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) (10,23 – 16,27%) e, majoritariamente em todas as amostras, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (68,64 – 77,08%).

Na Tabela 3.3 estão expostos os percentuais de todos os ácidos graxos detectados nas amostras de bagaço de uva, sendo que os ácidos graxos preponderantes foram o ácido linoleico (54,58 – 64,49%), o ácido α -linolênico (6,77 – 20,50%), o ácido oleico (10,01 – 15,92%), o ácido palmítico (5,83 – 7,61%) e o ácido esteárico (2,59 – 3,34%). Com ênfase para os maiores percentuais obtidos de ácido linoleico, 65,49 %, e ácido α -linolênico 20,50%, encontrados nas variedades ME e CS, respectivamente, pois estes ácidos são considerados ácidos graxos essenciais não serem sintetizados pelo organismo humano, mas exercerem funções estruturais das membranas celulares e em diversos processos metabólicos, além de contribuírem para a regulação hormonal (YOUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

TABELA 3.3 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

Ácidos graxos	CS ¹ (<i>Vitis vinífera</i>)	ME ¹ (<i>Vitis vinífera</i>)	MI ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)	TE ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)
C11:0	n.d.	0,04 ^a ± 0,00	0,04 ^a ± 0,00	0,02 ^b ± 0,02
C13:0	0,08 ^c ± 0,01	0,18 ^a ± 0,00	0,11 ^b ± 0,01	0,10 ^b ± 0,00
C14:0	0,04 ^b ± 0,00	0,10 ^a ± 0,00	0,05 ^b ± 0,01	0,03 ^b ± 0,03
C14:1	n.d.	0,02 ^a ± 0,01	n.d.	n.d.
C16:0	5,83 ^b ± 0,46	7,15 ^a ± 0,04	7,53 ^a ± 0,77	7,61 ^a ± 0,02
C16:1	0,10 ^a ± 0,01	0,64 ^a ± 0,61	0,18 ^a ± 0,02	0,18 ^a ± 0,00
C17:0	0,04 ^a ± 0,00	n.d.	n.d.	0,03 ^a ± 0,03
C18:0	3,34 ^a ± 0,23	2,59 ^a ± 1,08	2,90 ^a ± 0,28	2,78 ^a ± 0,08
C18:1 (<i>cis</i>)	10,01 ^b ± 0,69	12,21 ^b ± 0,11	15,92 ^a ± 1,67	15,70 ^a ± 0,05
C18:2 (<i>trans</i>)	1,28 ^a ± 0,24	0,43 ^b ± 0,02	0,58 ^b ± 0,01	0,45 ^b ± 0,03
C18:2 (<i>cis</i>)	54,58 ^c ± 2,78	65,49 ^a ± 0,31	56,08 ^{bc} ± 1,80	59,46 ^b ± 1,29
C18:3 (α)	20,50 ^a ± 3,53	8,26 ^b ± 0,09	10,96 ^b ± 0,14	6,77 ^b ± 0,03
C18:3 (γ)	0,69 ^c ± 0,05	1,67 ^b ± 0,01	1,89 ^{ab} ± 0,17	1,95 ^a ± 0,02
C20:0	0,18 ^b ± 0,01	0,27 ^{ab} ± 0,07	0,33 ^a ± 0,01	0,20 ^b ± 0,00
C20:1	0,12 ^b ± 0,01	0,17 ^a ± 0,01	0,17 ^a ± 0,02	0,16 ^a ± 0,01
C20:2	0,04 ^a ± 0,02	n.d.	n.d.	0,02 ^a ± 0,02
C22:0	0,08 ^b ± 0,00	0,15 ^b ± 0,00	0,39 ^a ± 0,01	0,38 ^a ± 0,08
C24:0	0,03 ^c ± 0,00	n.d.	0,17 ^b ± 0,03	0,24 ^a ± 0,01
Σ AGS	9,62^a ± 0,71	10,47^a ± 1,00	11,52^a ± 1,08	11,40^a ± 0,20
Σ AGMI	10,23^c ± 0,71	13,04^b ± 0,52	16,27^a ± 1,71	16,04^a ± 0,05
Σ AGPI	77,08^a ± 0,96	75,84^a ± 0,39	69,51^b ± 1,69	68,64^b ± 1,32
n-6/n-3	2,70^c ± 0,61	6,64^a ± 0,04	4,41^b ± 0,18	6,87^a ± 0,12
Σ AGT	96,94^{ab} ± 0,46	99,35^a ± 1,13	97,30^{ab} ± 1,09	96,09^b ± 1,45

* Todos os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3) em percentual (%). Letras diferentes entre as amostras na mesma linha apresentam diferença estatística entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$). n.d. = não detectado. ¹Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME), Mix (MI - Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e Terci (TE). AGS, AGMI, AGPI e AGT, ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e totais, respectivamente.

De acordo com Morris et al. (2003), uma dieta contendo ácidos graxos poli-insaturados, pode auxiliar na redução do risco do mal de Alzheimer, bem como na prevenção de outras doenças degenerativas. Além disso, estes ácidos graxos também podem auxiliar na síntese da hemoglobina e na divisão celular, além de participarem da produção de energia e da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo (YEHUDA et al., 2002).

Estudos sugerem que o consumo de ácidos graxos poli-insaturados pode contribuir significativamente no combate a doenças cardiovasculares (HU; WILLETT, 2002) e auxiliar no transporte das vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K (WARD; SINGH, 2005).

Entretanto, a razão entre o consumo dos ácidos graxos linoleico (C18:2 n-6) e α -linolênico (C18:3 n-3) na dieta é um importante fator para determinar a ingestão adequada destes ácidos graxos poli-insaturados e há necessidade de um equilíbrio entre as disponibilidades destes ácidos graxos na alimentação. Porque, o excesso do ácido linoleico, por exemplo, poderá impedir, por efeito de competição pela enzima Δ -6-dessaturase, a transformação do α -linolênico em seus derivados de cadeia longa, os ácidos eicosapentaenoico (EPA C20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA C22:6 n-3), os quais tem funções em quase todas as células do corpo humano (MORRIS, 2007), como o aumento de metabolismo e do crescimento muscular, a produção de energia, o transporte de oxigênio e o crescimento normal celular, proporcionando as funções nervosas adequadas e a regulação hormonal. O desbalanceamento dos ácidos graxos no organismo pode alterar toda a síntese dos eicosanoides e causar prejuízos à saúde.

As agências internacionais e alguns países da Europa recomendam que a razão n-6/n-3 deve estar entre 4:1 até 10:1 (MORRIS, 2007). Neste estudo, a razão n-6/n-3 variou entre 2,70:1 e 6,87:1. As amostras ME e TE foram estatisticamente diferentes das amostras CS e MI, mas entre si não diferiram ao nível de 5%, e apresentaram razão de 6,64:1 e 6,87:1, respectivamente. As variedades ME e TE tiveram seus resultados dentro dos limites internacionais, indicando assim, sua possibilidade de reaproveitamento com base nos teores de ácidos graxos.

3.4 CONCLUSÕES

Entre os compostos bioativos presentes nos bagaços de uva analisadas, pode-se concluir que na variedade MI estavam presentes a maioria dos ácidos fenólicos, entre eles o ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico e o ácido sirínico. Enquanto que a variedade ME se destacou pelos resultados relevantes para o ácido *trans*-cinâmico, quercetina, caempferol, resveratrol e para ácido linoleico.

Em todas as variedades foram identificadas 13 diferentes antocianinas, com sinais mais intensos para malvidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-3-*O*-acetilglicosídeo e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo, sendo que a variedade TE apresentou o maior teor de antocianinas totais.

Desta forma, considerando os teores significativos dos diversos compostos bioativos encontrados no bagaço de uva e, que tais compostos apresentam efeitos benéficos à saúde, pode-se reaproveitar este resíduo no desenvolvimento de novos produtos devido o seu potencial funcional ou na extração de antocianinas, que são pigmentos naturais.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

4 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinifera* E *Vitis labrusca*)

RESUMO

O bagaço de uva, subproduto gerado a partir do processamento da uva, pode conter compostos bioativos remanescentes da extração incompleta durante os processos de produção industrial do vinho. Os compostos bioativos podem ter efeitos benéficos à saúde, ligados principalmente, a sua atividade antioxidante. No entanto, a bioatividade desses compostos é apresentada com base nos ensaios *in vitro*. Contudo, como antioxidantes em sistemas biológicos, os compostos bioativos podem proteger os constituintes celulares e limitar o risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante dos compostos bioativos dos bagaço de uva das variedades Cabernet Sauvignon (CS) e Merlot (ME) (*Vitis vinifera* L.), Terci (TE) e Mix (MI) (*Vitis labrusca* L.) por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os resultados dos ensaios *in vitro* mostraram que o bagaço de uva da variedade ME apresentou elevada capacidade antioxidante com base nos métodos DPPH ($2,58 \pm 0,07 \text{ mg mL}^{-1}$) e auto-oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico ($70,60 \pm 0,91 \%$). A variedade TE se destacou pelos métodos DPPH ($2,70 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), ABTS ($0,88 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e auto-oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico ($90,19 \pm 0,37 \%$). E apenas a variedade MI teve a maior atividade antioxidante pelo método FRAP ($35,76 \pm 4,35 \text{ } \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g de bagaço de uva}$). Com relação à geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Holtzman, os resultados mostraram que houve uma diminuição na formação de EROs à medida que a concentração dos extratos aumentava de 0,1 a 1,0 mg mL^{-1} . Os experimentos *in vivo* consistiram em avaliar o efeito dos bioativos sobre as alterações no estado oxidativo causadas pela artrite induzida por adjuvante em ratos, mais especificamente sobre os níveis de EROs e a peroxidação lipídica no fígado e no cérebro. Apenas a variedade ME foi analisada, já que esta foi a que apresentou inibição significativa da geração de EROs em mitocôndrias isoladas. Os dados obtidos mostraram uma tendência em restabelecer os níveis de estresse oxidativo encontrados no grupo controle, indicando um efeito antioxidante do extrato de ME nas condições *in vivo*. A partir dos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* pode-se inferir que os bagaços de uva apresentaram potencial antioxidante e podem ser reaproveitados pela indústria de alimentos e farmacêutica como fonte alternativa de alimentos funcionais, suplementos ou formulação de nutracêuticos.

Palavras-chave: Compostos bioativos, capacidade antioxidante, geração de espécies reativas, artrite induzida por adjuvante.

4.1 INTRODUÇÃO

A uva é uma das frutas mais cultivadas ao redor do mundo, sendo rica em compostos bioativos, principalmente, os compostos fenólicos. Com a elevada produção de uva, uma quantidade expressiva de resíduos é gerada a partir do seu processamento para produção de sucos e vinhos. Entre os resíduos gerados, tem-se o bagaço de uva que contém compostos bioativos remanescentes devido a sua extração incompleta durante o processamento. A concentração destes compostos no bagaço de uva depende da variedade da uva, das reações durante o estágio de maturação, época de colheita da fruta e a eficiência do processamento empregado (XIA et al., 2010; DUMITRIU et al., 2015).

Na literatura há vários estudos que relatam a presença de compostos bioativos em bagaço de uva como os flavonoides, estilbenos e ácidos fenólicos (ANASTASIADI et al., 2010), como também apontam evidências dos efeitos benéficos à saúde atribuídos a antocianinas e flavonoides (DOWNEY; MAZZA; KRSTIC, 2007), ao resveratrol (YANG; MARTINSON; LU, 2009) e aos polifenóis (DENG; PENNER; ZHAO, 2011) ligados principalmente a sua atividade antioxidante, que se dá pela supressão da formação de radicais livres (por quelação de metais ou por inibição de enzimas geradoras de radicais livres) ou participação em processos de reparo de danos oxidativos, os quais podem ocorrer por mecanismos de transferência de átomo de hidrogênio (*hydrogen atom transfer* – HAT) e/ou por transferência de elétron (*single electron transfer* – SET) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os estudos que relatam a bioatividade dos compostos, em bagaço de uva, normalmente, são apresentados com base nos testes *in vitro*, através dos métodos de DPPH, o ABTS, a habilidade de redução do complexo Fe^{3+} /TPTZ, do sistema da auto-oxidação β -caroteno/ácido linoleico, entre outros. No entanto, como antioxidantes em sistemas biológicos, os compostos bioativos podem proteger os constituintes celulares e limitar o risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo (ANASTASIADI et al., 2010). Desta forma, os compostos bioativos podem apresentar relevante importância na prevenção e tratamento de algumas doenças, devido as propriedades farmacológicas, como anti-alérgicas, anti-arteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas e também efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001).

No caso específico da artrite reumatoide, a progressão da doença em pacientes artríticos pode ser atribuída ao aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo nos sítios de lesão (SEVEN et al., 2008). A artrite reumatoide é uma doença

multissistêmica, em adição às articulações, também afeta outros órgãos, tais como fígado, pulmão e tecido vascular (SANGHA, 2000; SATTAR et al., 2003). Para avaliação de drogas anti-inflamatórias e antirreumáticas, aplica-se o modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund, que é uma imunopatologia experimental em ratos que apresenta muitas semelhanças com a artrite reumatoide humana: hiperplasia sinovial, inflamação sistêmica, caquexia e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e nos sítios de lesão (BENDELE et al., 1999; SZEKANECZ et al., 2000). Assim, é possível ter uma dimensão de como se dá o comportamento dos sítios de inflamação (articulação, plasma, fígado, entre outros) em ratos e em indivíduos com artrite reumatoide.

Com base no exposto, é importante traçar novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença, incluindo o uso de fitoterápicos, bem como a utilização de alimentos funcionais que apresentam antioxidantes naturais. Como o bagaço de uva contém compostos bioativos que podem apresentar atividade antioxidante, estes poderiam ser aplicados na redução do estresse oxidativo causado pela doença.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante dos compostos bioativos dos bagaços das variedades Cabernet Sauvignon (CS) e Merlot (ME) (*Vitis vinifera* L.), Terci (TE) e Mix (MI) (*Vitis labrusca* L.) por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro*, além dos procedimentos químicos usuais, incluirão também um importante ensaio biológico, qual seja, a produção de EROs em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O ensaio *in vivo* será realizado utilizando ratos com artrite induzida por adjuvante, os quais normalmente apresentam elevados níveis de estresse oxidativo em vários tecidos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 EXTRAÇÃO

As condições do processo de extração foram realizadas com base na metodologia de Haminiuk et al. (2012), com modificações. A extração foi realizada na proporção 1:50 (m/v), onde 0,8 gramas de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) foram transferidos para erlenmeyers e adicionados 40 mL da mistura álcool metílico (Dinâmica, Brasil) e água destilada, 40:60 (v/v), respectivamente. Os erlenmeyers contendo bagaço de uva e solvente foram submetidos à agitação em shaker (TE420, TECNAL, Brasil) a 100 rpm por 24 horas e a temperatura de 25 °C. Após, o período de extração, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (Centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL, Fanem, Brasil) a $3493 \times g$ (5.000 rpm) por 25 minutos. Os extratos foram filtrados e analisados logo após a extração.

4.2.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS NÃO BIOLÓGICOS

4.2.2.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH^{*}

O método da inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) foi realizado de acordo com Mensor et al. (2001). Para cada uma das variedades de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) preparou-se solução mãe na concentração de 1 mg mL^{-1} e a partir desta, sete diferentes concentrações (500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 ppm) foram elaboradas para avaliação da atividade antioxidante. Solução de DPPH (Sigma-Aldrich), 1 mL em metanol ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) foi adicionado a 2,5 mL das diferentes concentrações de amostra e a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Para o controle houve apenas a substituição do volume da amostra, pelo metanol (Dinâmica). Com relação ao branco, adicionou-se 1 mL de metanol a 2,5 mL da solução mãe de cada variedade. Em seguida, foi determinada a absorvância em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1100) a 518 nm. Por meio da análise de regressão não linear entre as diferentes concentrações das amostras e o percentual de atividade antioxidante (AA), obtido pela equação 1, foi possível determinar a atividade antioxidante com base no valor de CE_{50} , calculado pela redução de 50% da concentração inicial de DPPH.

$$AA(\%) = 100 - \{[(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100] / A_{controle}\} \quad (1)$$

4.2.2.2 Atividade sequestrante de radical ABTS^{•+}

A determinação da atividade antioxidante pela formação do radical ABTS^{•+} foi conduzida conforme o método proposto por Thaipong et al. (2006), com modificações. O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 7,4 mM de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (Sigma-Aldrich) com 2,6 mM de persulfato de potássio (Sigma-Aldrich), em quantidades iguais. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 12 horas. Uma vez formado, o radical ABTS^{•+} foi diluído em metanol até obter uma medida de absorvância de 1,1 (± 0,02) em comprimento de onda de 734 nm em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1100). Para cada uma das variedades de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) preparou-se diluições que variaram entre 5 e 0,25 mg mL⁻¹. A reação entre 150 µL das diferentes concentrações de amostra e 2850 µL da solução contendo o radical ABTS^{•+} ocorreu durante 120 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi realizada a leitura a 734 nm. Como branco foi utilizado metanol ao invés do radical ABTS^{•+} e, para o controle foi adicionado metanol no lugar da amostra. Assim, foi possível determinar a atividade antioxidante com base no valor calculado pela redução de 50% da concentração inicial do radical ABTS^{•+}, conforme equação 1 descrita no item 4.2.2.1.

4.2.2.3 Auto-oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante foi avaliada pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico de acordo com a metodologia de Emmons, Peterson e Paul (1999). A emulsão β-caroteno/ácido linoleico (Sigma-Aldrich) foi preparada pela mistura de 2 mg de β-caroteno com 20 mL de clorofórmio, em seguida 3 mL dessa solução foram adicionados a 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40 (Sigma-Aldrich). O clorofórmio foi completamente evaporado com Nitrogênio (N₂). Foram adicionados 100 mL de água deionizada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio durante 30 minutos). Uma alíquota de 3 mL da emulsão β-caroteno/ácido linoleico foi misturada com 40 µL do extrato das variedades de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) em cinco diferentes concentrações (0,5, 1, 5, 10 e 20 mg mL⁻¹) e incubada em banho-maria a 50 °C. As amostras controle tinham 40 µL de metanol no lugar do extrato em diferentes concentrações. A absorvância inicial foi feita imediatamente

após a adição das amostras ao sistema para a determinação do tempo zero. A oxidação da emulsão foi monitorada por espectrofotometria (Pró-Análise UV-1100) em 470 nm por um período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 50 °C durante a reação. A capacidade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição da oxidação, conforme a equação 2.

$$AOA (\%) = 100 \times \left(\frac{DR_c - DR_s}{DR_c} \right) \quad (2)$$

Onde: AOA é o percentual de inibição da oxidação, a DR_c é a taxa de degradação do controle = $\ln(a/b)/60$, DR_s é a taxa de degradação da amostra = $\ln(a/b)/60$, **a** é a absorvância inicial no tempo 0 e **b** é a absorvância a 120 minutos.

4.2.2.4 Método de redução do ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com Thaipong et al. (2006). As soluções utilizadas foram tampão acetato de sódio 300 mM (Vetec) em pH 3,6, solução TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) 10 mM (Sigma-Aldrich) em ácido clorídrico 40 mM (Vetec) e solução de cloreto férrico 20 mM (Synth). Para a formação do reagente FRAP foram misturados 25 mL da solução de tampão acetato de sódio, 2,5 mL da solução TPTZ e 2,5 mL da solução de cloreto férrico, em seguida a solução foi aquecida em banho-maria a 37 °C. Para a análise das amostras, 150 µL de extrato das variedades de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) em 4 diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1, 2 mg mL⁻¹) foram misturados com 2850 µL do reagente FRAP ao abrigo da luz e conduzidos ao banho-maria a 37 °C durante 30 minutos. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Pró-Análise UV-1100) a 593 nm. Os resultados foram expressos em µM sulfato ferroso g⁻¹ de bagaço de uva, obtidos a partir de uma curva padrão de sulfato ferroso de 100 – 2000 µM.

4.2.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

4.2.3.1 *Extração*

As condições do processo de extração foram realizadas com base na metodologia de Haminiuk et al. (2012), com modificações. A extração foi realizada na proporção 1:50 (m/v), onde 0,8 gramas de bagaço de uva (CS, ME, MI e TE) foram transferidos para erlenmeyers e adicionados 40 mL da mistura álcool etílico (Impex, Brasil) e água destilada, 40:60 (v/v), respectivamente. Os erlenmeyers contendo bagaço de uva e solvente foram submetidos à agitação em shaker (Te 421, Tecnal) a 100 rpm por 24 horas e a temperatura de 25 °C. Após o período de extração, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas (Rotanta 460 R, Analítica) a $3493 \times g$ (5.000 rpm) por 25 minutos. Os sobrenadantes foram liofilizados e conservados em freezer para posterior análise.

4.2.3.2 *Experimentos com mitocôndrias isoladas*

a) Isolamento de mitocôndrias

Os ratos machos da linhagem Holtzman foram decapitados, seus fígados removidos imediatamente e fragmentados com tesoura. Os fragmentos foram suspensos em meio contendo manitol 0,2 M, sacarose 75 mM, Tris-HCl 1.0 mM (pH 7,4), etileno glicol-bis-(β -eteraminometílico) tetra-acetato 1 mM (EGTA) e albumina de soro bovino livre de ácidos graxos 50 mg%. A homogeneização foi realizada no mesmo meio com um homogeneizador de Van Potter–Elvehjem. Após a homogeneização, as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação fracionada, aproximadamente $3000 \times g$ para eliminar núcleos, membranas e material mais pesado, seguido de 2200 – 8000 rpm para precipitar as mitocôndrias (VOSS; CAMPELLO; BACILA, 1961; BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, 2003). As organelas isoladas foram suspensas no meio de isolamento e mantidas a 0 – 4 °C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As mitocôndrias isoladas dos fígados dos ratos Holtzman foram utilizadas para a determinação da geração de EROs.

b) Determinação da geração de espécies reativas ao oxigênio mitocondrial

O nível de produção de ERO mitocondrial, basicamente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi estimado por mensuração do aumento linear de fluorescência (504 nm emissão e 529 nm excitação) (ZACCAGNINO et al., 2009). O H_2O_2 induz oxidação da diclorofluoresceína formando um composto fluorescente na presença da enzima horse-peroxidase (HRP). Mitocôndrias intactas (aproximadamente 0,8 mg de proteína) foram adicionadas em 2 mL de tampão Manitol 250 mM, Hepes 10 mM pH 7.2, contendo 1,36 μ M de DCFA-DA e succinato (10 mM) + rotenona (10 μ M) ou glutamato (10 mM) + Malato (10 mM) + antimicina (15 μ M). A reação foi iniciada pela adição de 0,4 μ M de HRP, e a fluorescência registrada em intervalo de 1 minuto durante 10 minutos. Todo o ensaio ocorreu sob agitação. Os resultados foram expressos em nmoles de EROs produzido por minuto por miligrama de proteína.

4.2.3.3 Análise estatística

O planejamento estatístico foi baseado em trabalhos da área de metabolismo celular. A análise estatística foi realizada por meio de GraphPad Prism Software (versão 5.0). As análises de significância foram realizadas entre médias \pm desvio padrão das médias obtidas de dois conjuntos de animais: controles (saudáveis) e “tratados” (adição de concentrações dos extratos). O teste *Newmam-Keuls* foi aplicado e o nível de 5% ($p < 0,05$) foi adotado como critério de significância.

4.2.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vivo*

4.2.4.1 Manipulação dos animais

Na Tabela 4.1 encontram-se a divisão dos grupos dos ratos utilizados neste estudo, sendo todos machos da linhagem Holtzman, alimentados *ad libitum* com ração balanceada (Nuvilab[®], Colombo, Brasil) e mantidos em um ambiente com controle de temperatura ($22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12h/12h).

TABELA 4.1 – DIVISÃO E DESCRIÇÃO DOS GRUPOS DE RATOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Grupo	Descrição
1	Controle – ratos não artríticos sem tratamento
2	Controle – ratos não artríticos com tratamento
3	Ratos artríticos sem tratamento
4	Ratos artríticos com tratamento

O extrato foi administrado por gavagem em ratos do grupo 2 e 4, iniciando 5 dias antes da indução da artrite. Esses ratos receberam o extrato por mais 18 dias após a indução, com doses diárias de 250 mg do extrato (etanólico 40% bagaço uva da variedade ME) por kg de peso corporal. Ratos do grupo 1 (controle) e grupo 3 (artríticos sem tratamento) foram submetidos ao processo de gavagem diariamente e receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9 % nas mesmas condições dos grupos 2 e 4. No 19º dia após a indução da artrite, os animais (todos os grupos) foram eutanasiados após jejum de 12 horas.

4.2.4.2 Indução da artrite

A indução da artrite foi realizada no Laboratório de Inflamação, do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Estadual de Maringá. A artrite por adjuvante foi induzida em ratos com 50 dias de idade, através da injeção intradérmica na pata traseira esquerda com 0,1 mL de adjuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* derivadas de cepa humana H37Rv) e inativadas pelo calor, suspensas em óleo mineral 0,5 % (m/v) (PEARSON; WOOD, 1963). Animais controle receberam injeção com óleo mineral, nas mesmas condições estabelecidas para indução da artrite. Todos os experimentos com a indução de artrite foram realizados de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) em reunião de 14/08/2015 sob o CEUA nº 8119260115.

4.2.4.3 Ensaaios oxidativos

a) Preparação do homogenato dos tecidos: fígado e cérebro

O fígado e o cérebro dos ratos foram cirurgicamente removidos, clampeados em nitrogênio líquido e estocados a temperaturas inferiores a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para preparar os homogenatos, os fígados e os cérebros clampeados foram pesados e homogeneizados em homogeneizador do tipo Van Potter Elvehj em com dez volumes de tampão fosfato de potássio $0,1\text{ M}$ ($\text{pH} = 7,4$). Os homogenatos dos tecidos foram utilizados para as determinações de estresse oxidativo: peroxidação lipídica (TBARS) e espécies reativas ao oxigênio (EROs). O teor de proteína foi dosado no homogenato total e no sobrenadante (LOWRY et al., 1951).

b) Determinação da peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica nos homogenatos dos tecidos dos ratos foram determinados pelo método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) conforme descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com algumas modificações. Esta técnica quantifica moléculas de baixo peso molecular, predominantemente o dialdeído malônico (MDA), que reagem com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e são extraídas pelo *n*-butanol. A um volume de $75\text{ }\mu\text{L}$ de homogenato ($1,0$ a $2,0\text{ mg}$ de proteína) foram adicionados $200\text{ }\mu\text{L}$ de SDS (duodecil sulfato de sódio) $8,1\%$, $40\text{ }\mu\text{L}$ de BHT (2,6-Di-terc-butil-4-metilfenol) 10 mM , $1,5\text{ mL}$ de ácido acético 20% , $1,5\text{ mL}$ de solução aquosa de TBA $0,67\%$ e o volume completado para $4,0\text{ mL}$ com água deionizada. Os tubos com tampas de rosca foram vedados e colocados em banho-maria a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Após o período de incubação, os tubos foram resfriados em banho de gelo e o complexo MDA-TBA extraído com $4,0\text{ mL}$ de *n*-butanol/piridina $15:1\text{ (v/v)}$. Após centrifugação a $1800 \times g$ por 10 minutos, a fase orgânica foi coletada e a absorvância determinada a 532 nm . A concentração de lipoperóxidos foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ e os valores expressos como nmol de TBARS por mg de proteína.

c) Determinação de espécies reativas ao oxigênio

Os níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no sobrenadante dos homogenatos de fígado e de cérebro dos ratos foram determinados por espectrofluorimetria conforme descrito por Posadas et al. (2009) com algumas modificações.

4.2.4.4 *Análise estatística*

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão. Uma forma de análise de variância (ANOVA) com post-hoc teste de Student-Newman-Keuls foi realizado e $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS NÃO BIOLÓGICOS

Para mensurar a capacidade antioxidante existem diferentes metodologias, no entanto há a necessidade de aplicá-las concomitantemente devido não somente a complexidade das amostras em relação à presença de compostos com diferentes solubilidades, mas também, devido sua reação sobre diferentes sistemas oxidativos. Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante podem diferir em relação ao mecanismo de reação, no que se refere às espécies-alvo, às condições em que ocorre a reação e na forma de expressar os resultados (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Além disso, segundo Pinelo et al. (2005) e Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006), alguns fatores podem influenciar a determinação da capacidade antioxidante porque podem afetar a transferência de elétrons (SET) e a transferência de átomos de hidrogênio (HAT), entre eles, tem-se o tipo de solvente utilizado na extração dos compostos e a sua polaridade, a temperatura e o tempo de extração, a razão massa/volume e a matriz vegetal avaliada. No caso do solvente, de acordo com Sharma e Bhat (2009), o metanol apresenta maior sensibilidade quanto comparado a outros solventes, tais como o álcool etílico, a acetona e o acetato de etila. Por este motivo, para a avaliação da capacidade antioxidante através dos métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico utilizou-se metanol (40%) como solvente de extração.

Os resultados obtidos para os métodos DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoleico foram expressos com base na concentração eficiente ou efetiva (CE_{50}), cujo valor representa a

quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do reagente, DPPH ABTS ou β -caroteno/ácido linoleico, em 50%. Desta forma, para os bagaços de uva das variedades CS, ME, MI e TE foram preparadas diferentes concentrações a fim de obter os resultados com base nos valores de CE_{50} . Por exemplo, conforme Sousa (2007), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior será a atividade antioxidante.

O método DPPH é amplamente utilizado por ser rápido, simples, estável e barato em comparação com outros métodos. Os resultados referentes ao método DPPH estão apresentados na Figura 4.1, nos quais foi possível perceber que entre as variedades ME e TE não houve diferença estatística ao nível de 5% e que ambas tiveram os menores valores de CE_{50} , $2,58 \pm 0,07$ e $2,70 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. Portanto, foram as amostras com maior atividade antioxidante.

Os resultados obtidos no método DPPH podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos como os ácidos fenólicos e os flavonoides. Segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) os derivados de ácidos hidroxicinâmicos são melhores antioxidantes dos que os ácidos hidroxibenzoicos, porque a dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CHCOOH}$) participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzoico não apresentam essa característica. Além disso, Von Gadow, Joubert e Hansmann (1997) estudaram a reação de ácidos fenólicos e flavonoides com o radical livre DPPH $^{\bullet}$ e verificaram que os compostos fenólicos como os ácidos cafeico, sirínico e *p*-cumárico, e os flavonoides, rutina e catequina, apresentaram elevados valores de CE_{50} e, portanto, menor atividade antioxidante.

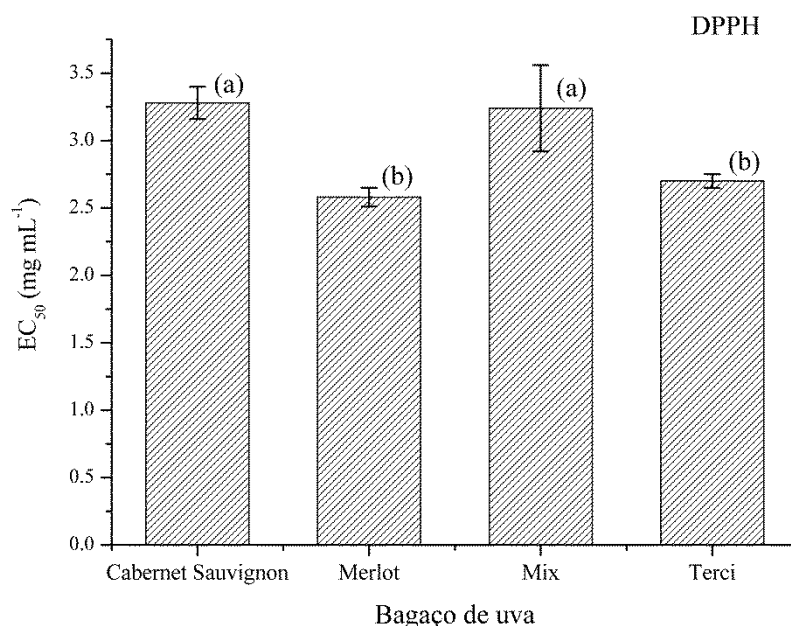


FIGURA 4.1 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE). VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)

Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)

As variedades CS e MI não apresentaram diferenças estatísticas entre si, com valores elevados de CE_{50} , $3,28 \pm 0,12$ e $3,24 \pm 0,32$ mg mL⁻¹, respectivamente, e, portanto menor atividade antioxidante quando comparadas as variedades ME e TE. Ao relacionar os resultados descritos no Capítulo 3, Tabela 3.1 com os estudos de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e de Von Gadow, Joubert e Hansmann (1997) citados anteriormente, pode-se inferir que a baixa atividade antioxidante das amostras CS e MI devem-se aos teores significativos dos ácidos hidroxibenzoicos, ácido gálico, ácido sirínico e dos flavonoides catequina e rutina presentes nestas variedades.

Desta forma, as diferenças entre os resultados podem ser associadas não somente pela diferença entre as variedades em relação à procedência (local de cultivo), as diferentes espécies *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*, a presença de luz, oxigênio e pH da solução de reação que afetam a absorvância do DPPH. Mas também, podem estar relacionadas à presença dos compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonoides específicos que não reagem com o DPPH.

Outro método aplicado para estimar a capacidade antioxidante nas variedades CS, ME, MI e TE, foi o método ABTS que se baseia na captura do radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($ABTS^{\bullet+}$) que pode ser gerado através de uma reação

química com persulfato de potássio (RE et al., 1999). O ABTS também é um radical sintético assim como o DPPH, entretanto, é mais versátil porque tem como vantagens a reação com compostos hidrofílicos e lipofílicos, assim como pode ser aplicado em soluções tanto com solventes aquosos quanto orgânicos, além de poder reagir com compostos em uma ampla faixa de pH (HADDOUCHI et al., 2014).

Os resultados obtidos por meio do método ABTS estão apresentados na Figura 4.2, e foram expressos com base na CE_{50} . Desta forma, as variedades TE e MI que apresentaram os menores valores para CE_{50} , $0,88 \pm 0,01$ e $0,89 \pm 0,02$ mg mL⁻¹, respectivamente, possuem maior atividade antioxidante e não diferiram entre si ao nível de 5%. Enquanto que a variedade CS teve menor atividade antioxidante, como CE_{50} correspondendo a $1,80 \pm 0,14$ mg mL⁻¹.

Rockenbach et al. (2008) em seu estudo sobre compostos fenólicos e atividade antioxidante de bagaços da vinificação de uvas tintas, relatou que as variedades Cabernet Sauvignon, Bordô, Merlot e Isabel apresentaram, nessa ordem, os maiores valores para atividade antioxidante com base no método ABTS com resultados expressos em $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox). Enquanto que no presente estudo, os maiores teores de atividade antioxidante foram para as variedades MI, TE, ME e CS expressos com base na CE_{50} . Apesar da forma de análise e expressão dos resultados finais serem diferentes nos dois estudos, foi possível verificar similaridades e diferenças. Entre elas, a mesma posição ocupada pelas variedades Terci (também conhecida como Bordô) e Merlot na ordem de determinação da atividade antioxidante em ambos os estudos. Em relação às diferenças, a variedade Cabernet Sauvignon teve a maior atividade antioxidante e a Isabel apresentou o menor valor, enquanto que no presente estudo, ocorreu a inversão dos resultados, pois a variedade CS teve o menor potencial antioxidante.

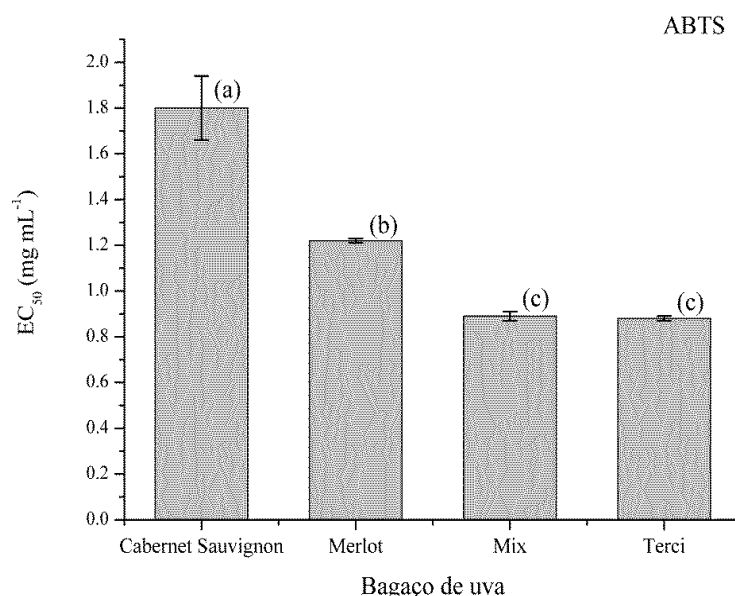


FIGURA 4.2 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCI (TE). VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)

Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)

Segundo Haddouchi et al. (2014), o método ABTS é fracamente correlacionado com os polifenóis e os taninos, dependendo da complexidade da matriz de análise. Além disso, os resultados também podem ser influenciados pela concentração e poder antioxidante da substância avaliada e o tempo de reação.

A avaliação da capacidade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico consiste no poder de inibição que um antioxidante exerce sobre os radicais formados durante a peroxidação do ácido linoleico, por meio de medidas espectrofotométricas que medem a descoloração do β -caroteno. Assim, a taxa de degradação de β -caroteno/ácido linoleico depende dos diferentes antioxidantes presentes nos extratos que podem neutralizar os radicais do linoleato e outros radicais formados neste sistema (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; DUARTE ALMEIDA et al., 2006; MAISARAH et al., 2013).

Na Figura 4.3 estão apresentados os percentuais de inibição pelo método β -caroteno/ácido linoleico das variedades CS, ME, MI e TE em diferentes concentrações, variando de 0,5 a 20 mg mL⁻¹. Os bagaços de uva das variedades TE e ME na concentração máxima de 10 mg mL⁻¹, tiveram os seguintes percentuais de inibição, $90,19 \pm 0,37$ % e $70,60$

$\pm 0,91$ %, respectivamente. Por outro lado, os bagaços de uva MI e CS, apresentaram $93,63 \pm 1,66$ % e $75,24 \pm 7,25$ % na concentração de 20 mg mL^{-1} .

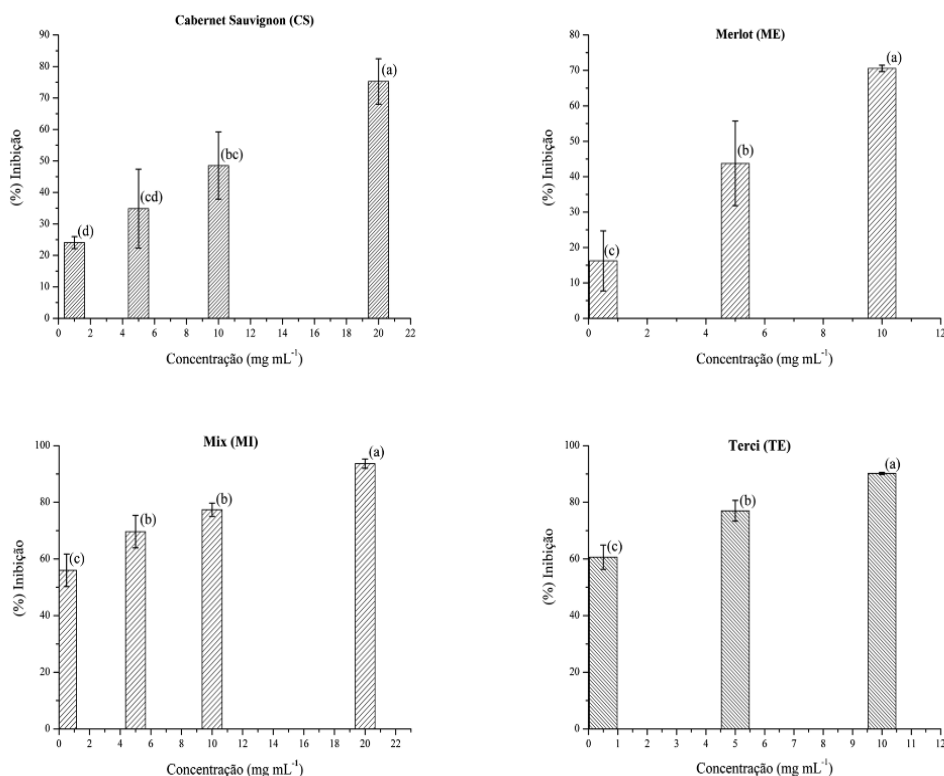


FIGURA 4.3 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO PELO MÉTODO DA AUTO-OXIDAÇÃO DO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE). VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)

Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)

Os resultados obtidos indicam elevada capacidade antioxidante pelo método de auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico para as amostras TE e ME. Segundo Von Gadov, Joubert e Hansmann (1997), amostras com elevados teores de ácidos hidroxibenzoicos podem ser mais efetivas como antioxidantes, porque os grupos *o*-metoxil presentes em ácidos fenólicos como o ácido sirínico e o ácido vanílico, por exemplo, melhoram a estabilização do radical fenoxil. Ao avaliar os resultados previamente citados no Capítulo 3 (Tabela 3.1), para o teor de ácidos hidroxibenzoicos nas amostras analisadas no presente estudo, pode-se observar que a TE e a ME tem em sua composição fenólica, majoritariamente, os ácidos vanílico ($332,38 \pm 31,76 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sirínico ($368,73 \pm 17,86 \mu\text{g mL}^{-1}$). Assim, pode-se inferir que os resultados pelo método β -caroteno/ácido linoleico podem ter relação com o teor de ácidos hidroxibenzoicos.

Além disso, o teor de ácido linoleico presente, naturalmente, nas amostras pode interferir nos resultados. No Capítulo 3 (Tabela 3.3), o perfil de ácidos graxos mostra que os bagaços de uvas das variedades ME e TE tiveram os maiores valores de ácido linoleico, 66 e 60%, respectivamente.

Alguns trabalhos também relatam o elevado percentual de inibição pelo método de auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, como Jayaprakasha, Singh e Sakariah (2001), que utilizaram diferentes solventes em extratos de semente de uva e obtiveram 89,30% de inibição com acetato de etila em meio aquoso (proporção 17:3) e, Negro, Tommasi e Miceli (2003) relataram 73,50% de inibição da oxidação na utilização de extrato de bagaço de uva de concentração fenólica de 80 ppm.

Com relação ao método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), o mecanismo de reação se dá por transferência de elétrons e se baseia no poder antioxidante de redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Os resultados variaram entre $19,41 \pm 3,90$ e $35,76 \pm 4,35$ $\mu\text{M FeSO}_4$ por grama de bagaço de uva, conforme pode ser observado na Figura 4.4.

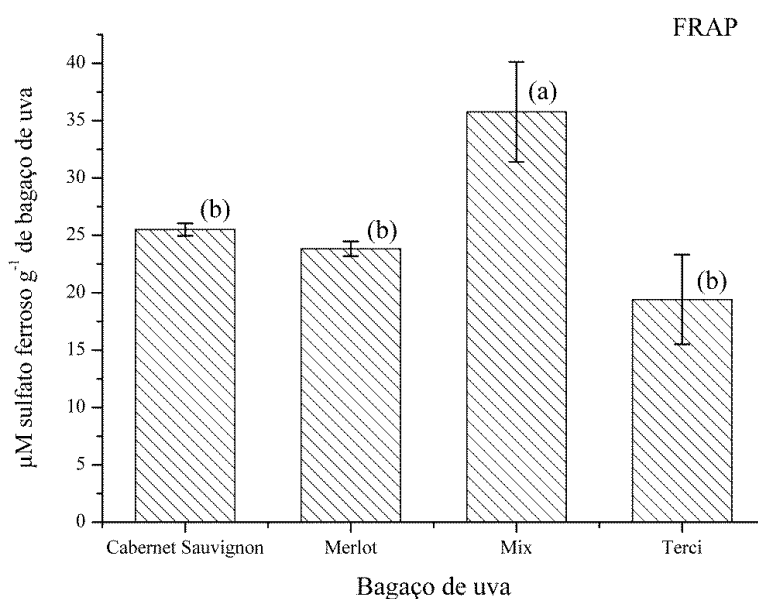


FIGURA 4.4 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES CABERNET SAUVIGNON (CS), MERLOT (ME), MIX (MI) E TERCÍ (TE). VALORES EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3). LETRAS DIFERENTES EM CADA COLUNA APRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE SI (TESTE DE TUKEY, $P < 0,05$)
Nota: Mix: composto pelas variedades Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)

A variedade MI teve a maior atividade antioxidante com $35,76 \pm 4,35$ $\mu\text{M FeSO}_4$ por grama de bagaço de uva. Segundo Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), a eficiência

antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas. Além disso, de acordo com Prior, Wu e Schaich (2005) os resultados podem variar enormemente também, dependendo do tempo de análise, porque alguns polifenóis, como ácido cafeico, ácido tânico, ácido ferúlico e quercetina, por exemplo, reagem lentamente e requerem tempos de reação mais longos para a detecção, em torno de 30 minutos.

Além do exposto, o teor de compostos fenólicos totais (CFT) é um fator importante na análise da atividade antioxidante pelo método FRAP, porque há uma relação entre o conteúdo de CFT e FRAP descrita em diversos estudos, entre eles o de Anastasiadi et al. (2010), que mostraram em seu estudo a elevada correlação entre os resultados de atividade antioxidante pelo método FRAP e o conteúdo de compostos fenólicos totais para subprodutos da uva, como as cascas e o vinho. Assim como Katalinic' (2010) e Xu, Zhang, Cao e Lu (2010) que também observaram coeficientes de correlação significativos entre o FRAP e os resultados para compostos fenólicos totais em extratos de casca de uva. E por fim, Lutz, Cajas e Henríquez (2012) concluíram que os valores de FRAP são dependentes do conteúdo de compostos fenólicos.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo estão coerentes com os relatos dos autores citados acima, pois foi possível verificar a relação direta entre os dados de atividade antioxidante pelo método FRAP e os resultados para o teor de CFT por Folin-Ciocalteu, citados anteriormente no capítulo 2 na Figura 2.1. A variedade MI apresentou os maiores valores tanto para o método FRAP quanto CFT ($p < 0,05$), seguida pelas variedades CS, ME e TE.

Em geral, a capacidade antioxidante dos compostos bioativos depende de três fatores: (a) o potencial de quelar metais, porque está fortemente relacionada ao arranjo dos grupos hidroxilas e carbonilas ao redor da molécula, (b) a presença de hidrogênio ou elétrons substituintes capazes de reduzir os radicais livres, e (c) a capacidade do flavonoide, por exemplo, de deslocar o elétron não emparelhado, conduzindo à formação de um radical fenoxil estável (MUSIALIK et al., 2009; SHAHIDI, AMBIGAIPALAN, 2015). Deste modo, dependendo da natureza química das moléculas antioxidantes, é importante o uso de diferentes métodos para fornecer uma estimativa mais precisa para as amostras analisadas.

4.3.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

As mitocôndrias são as organelas onde ocorre o metabolismo energético. A oxidação incompleta do oxigênio e/ou liberação de elétrons livres resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs estão envolvidas numa série de processos degenerativos e, sua formação pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim, formadas fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos. Ou ainda, podem ser oriundas do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo, gerando assim diferentes radicais livres (KIRKINEZOS; MORAES, 2001).

Tendo em vista, portanto, a importância das mitocôndrias como sítio de geração de EROs, investigou-se inicialmente os efeitos de extratos etanólicos a 40% de bagaço de uva das variedades CS, ME, MI e TE sobre a geração de EROs em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Holtzman.

Da Tabela 4.2 pode-se deduzir que os extratos etanólicos das quatro variedades do bagaço de uva interferiram significativamente na produção de EROs estimulada pela rotenona, inibidor natural do complexo I mitocondrial. Os resultados mostram que houve uma diminuição da formação de EROs à medida que a concentração dos extratos foi aumentada de 0,1 a 1,0 mg mL⁻¹. Assim como nos ensaios, descritos no item anterior 4.3.1, nos quais a variedade ME seguida pela TE teve maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH e sistema β-caroteno/ácido linoleico, o bagaço de uva da variedade ME (0,042 ± 0,017 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína) inibiu consideravelmente a produção de EROs mitocondrial, seguida pelas variedades TE, MI e CS. Fica demonstrado, desta forma, que os extratos possuem também atividade antioxidante em um sistema biológico.

A atividade antioxidante do bagaço de uva da variedade ME tanto nos ensaios químicos quanto no ensaio biológico pode estar ligada a vários fatores. Segundo Barreiros, David, David (2006) e Dorta et al. (2008), os compostos fenólicos, em particular, os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, além de serem potenciais agentes quimioprotetores ou suplementares contra diversos estados patológicos envolvendo dano oxidativo celular, sendo antioxidantes efetivos. A atividade antioxidante dos flavonoides ainda depende da sua estrutura e dos substituintes nos anéis B e heterocíclico C, da habilidade do flavonoide em deslocalizar o elétron desemparelhado, sendo que a presença de hidroxilas em *orto* é o principal fator que auxilia nessa deslocalização e, também, da capacidade de quelar metais de transição. Outro fator importante que influencia a atividade antioxidante dos

flavonoides é a sua interação com as biomembranas. Os flavonoides que possuem uma cadeia de açúcares ligada à sua estrutura são polares, não sendo assimilados pela membrana. No entanto, os flavonoides, como por exemplo, a quercetina, que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez, o que pode gerar um impedimento físico para a difusão das EROs, diminuindo a velocidade das reações responsáveis pelo estresse oxidativo.

TABELA 4.2 – GERAÇÃO DE EROs MITOCONDRIAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EXTRATOS ETANÓLICOS A 40% DE DIFERENTES BAGAÇOS DE UVA (*Vitis vinífera* E *Vitis labrusca*)

Bagaço de uva	CS ¹ (<i>Vitis vinífera</i>)	ME ¹ (<i>Vitis vinífera</i>)	MI ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)	TE ¹ (<i>Vitis labrusca</i>)
	EROs – (nmols/min. mg proteína)	EROs – (nmols/min. mg proteína)	EROs – (nmols/min. mg proteína)	EROs – (nmols/min. mg proteína)
Basal – ausente	0,188 ± 0,010	0,144 ± 0,023	0,386 ± 0,024	0,141 ± 0,012
Succinato				
Basal - Succinato	0,281 ± 0,020	0,213 ± 0,034	0,501 ± 0,011	0,187 ± 0,011
Rotenona				
Extrato [mg mL ⁻¹]	0,465 ± 0,040	0,392 ± 0,047	0,887 ± 0,045	0,572 ± 0,041
0,1	0,515 ± 0,025	0,286 ± 0,034	0,336 ± 0,017	0,326 ± 0,016
0,2	0,441 ± 0,051	0,151 ± 0,029	0,314 ± 0,035	0,164 ± 0,023
0,4	0,350 ± 0,030	0,114 ± 0,021	0,278 ± 0,052	0,077 ± 0,017
0,6	0,314 ± 0,027	0,102 ± 0,021	0,225 ± 0,031*	0,069 ± 0,031
0,8	0,298 ± 0,006	0,061 ± 0,013	0,220 ± 0,055	0,055 ± 0,025
1,0	0,300 ± 0,024	0,042 ± 0,017	0,100 ± 0,039	0,028 ± 0,002

* Todos os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n= 4). O símbolo * P < 0,05 X rotenona. GraphPad Prism Software (versão 5.0) e Teste *Newman-Keuls*. ¹Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME), Mix (MI - Bordô (65%), Isabel (25%) e BRS Violeta (10%)) e Terci (TE).

Desta forma, os teores elevados dos flavonoides quercetina (249,23 µg mL⁻¹) e caempferol (66,66 µg mL⁻¹) obtidos e relatados no Capítulo 3 (Tabela 3.1) deste estudo, podem ter influenciado na diminuição da geração de EROs pelas mitocôndrias. Outro composto bioativo majoritário, presente na amostra ME foi o resveratrol (36,31 µg mL⁻¹), sendo muito conhecido por sua atividade antioxidante através de diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, redução do complexo III da cadeia oxidativa, sítio de geração de ROS e atuando na indução de enzimas antioxidantes como a catalase, glutatona, superóxido dismutase, entre outros (FAN et al., 2008; ROBB et al., 2008).

Para obter resultados conclusivos em relação à atividade antioxidante sobre o organismo, foram realizados experimentos utilizando ratos da linhagem Holtzman com a artrite induzida por adjuvante (AIA) para avaliar mais parâmetros relacionados à atividade antioxidante *in vivo*, os quais estão descritos a seguir.

4.3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vivo*

A artrite reumatoide (AR) é uma segunda forma mais comum de artrite. É considerada uma doença autoimune porque ocorre quando o sistema imunológico ataca erroneamente os tecidos do seu próprio corpo, podendo também afetar outros órgãos, tais como pele, pulmões e vasos sanguíneos. A causa da artrite reumatoide é ainda desconhecida, mas alguns resultados de pesquisas realizadas nos últimos anos fornecem evidências para o envolvimento de vários fatores na causa da AR, entre eles, os radicais livres como espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (RNS) que podem danificar componentes das articulações e, consequentemente desencadear o processo inflamatório da artrite.

Como alternativas no tratamento dos processos inflamatórios da AR, pesquisas vem sendo desenvolvidas utilizando compostos fenólicos devido à sua capacidade anti-inflamatória. Desta forma, para avaliar o potencial antioxidante do bagaço de uva, aplicou-se o modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA) que é uma imunopatologia experimental em ratos com características semelhantes à da doença humana, a artrite reumatoide, a fim de analisar as alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo tecidual e nos sítios de inflamação. Além disso, optou-se por utilizar o extrato fenólico somente da variedade ME, já que a mesma apresentou resultados significativos na inibição de ROS mitocondrial nos ensaios descritos no item 4.3.2.

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4, pode-se perceber que o efeito antioxidante do extrato do bagaço de uva da variedade ME nos ratos com artrite induzida teve uma tendência em restabelecer os níveis avaliados de estresse oxidativo (TBARS) nos homogenato de fígado e cérebro dos ratos Holtzman, em relação ao grupo controle. O extrato quando administrado a animais saudáveis (controles) não causou nenhuma alteração nos parâmetros que foram avaliados.

TABELA 4.3 – ESTRESSE OXIDATIVO NO HOMOGENATO DE FÍGADOS DE RATOS HOLTZMAN

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
TBARS (mmols.mg ⁻¹)	1,08 ^a ± 0,14	1,00 ^a ± 0,09	1,61 ^b ± 0,17	1,18 ^a ± 0,16
EROs (mmols.mg ⁻¹)	1,08 ^a ± 0,09	1,06 ^a ± 0,10	2,82 ^b ± 0,27	1,72 ^c ± 0,15

* Todos os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n= 6). GraphPad Prism Software (versão 5.0) e Teste *Newman-Keuls* (p< 0,05). Grupo I: Controle: ratos não artríticos sem tratamento; Grupo II: Controle: ratos não artríticos com tratamento; Grupo III: Ratos artríticos sem tratamento; Grupo IV: Ratos artríticos com tratamento

Em relação à EROs no tecido hepático (Tabela 4.3), houve diferença significativa ao nível de 5%, do grupo III (ratos artríticos sem tratamento) quando comparado ao grupo I (controle). Assim como o grupo IV (ratos artríticos com tratamento) também apresentou diferença estatística em relação ao grupo I, sendo que se pode observar que houve uma tendência em restabelecer os níveis de EROs nos ratos artríticos tratados.

Na Tabela 4.4 os resultados referentes ao EROs cerebral mostram que não houve diferença estatística ao nível de 5% entre os grupos avaliados, no entanto, os resultados do grupo IV (ratos artríticos tratados) apresentaram uma tendência em restabelecer os valores do grupo I (controle).

TABELA 4.4 – ESTRESSE OXIDATIVO NO HOMOGENATO DE CÉREBRO DE RATO HOLTZMAN

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
TBARS (mmols.mg ⁻¹)	1,84 ^a ± 0,09	1,89 ^a ± 0,17	2,57 ^b ± 0,16	1,82 ^a ± 0,09
EROs (mmols.mg ⁻¹)	5,90 ^a ± 0,28	5,95 ^a ± 0,42	6,60 ^a ± 0,51	6,28 ^a ± 0,51

* Todos os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n= 6). GraphPad Prism Software (versão 5.0) e Teste *Newman-Keuls* (p< 0,05). Grupo I: Controle: ratos não artríticos sem tratamento; Grupo II: Controle: ratos não artríticos com tratamento; Grupo III: Ratos artríticos sem tratamento; Grupo IV: Ratos artríticos com tratamento

Estudos como os de Panico et al. (2006), Chacón et al. (2009), Terra et al. (2009), Rodrigo, Miranda e Vergara (2011) e Ambriz-Pérez et al. (2016) relatam as propriedades anti-inflamatórias de compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* onde os resultados mostraram a diminuição na concentração de óxido nítrico, prostaglandinas E2 e EROs, sendo que este efeito foi atribuído principalmente às propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos.

Com base no exposto acima, pode-se relacionar os resultados positivos para o restabelecimento dos níveis de EROs nos ratos artríticos tratados obtidos neste estudo com os compostos fenólicos majoritários presentes na variedade ME, como rutina, quercetina, caempferol, resveratrol, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico. Além disso, esses resultados corroboram os resultados obtidos nas avaliações de atividades antioxidantes desse extrato nos ensaios *in vitro*.

No entanto, os mecanismos pelos quais os compostos fenólicos exercem sua ação antioxidante não estão completamente elucidados. Sabe-se que a estrutura dos compostos fenólicos pode influenciar os mecanismos de ação antioxidante, como por exemplo, a insaturação no anel C que dá estabilidade para as espécies radicais intermediárias por

ressonância, a ligação dupla localizada em C2-C3 entre os anéis A e C que induz coplanaridade, estimulando a interação do flavonoide com o sítio ativo enzimático (LÄTTIG et al., 2007) e o grupo catecol no anel B que auxilia na oxidação enzimática, levando à formação de espécies eletrofílicas permitindo a adição nucleofílica (LAGO et al., 2014; AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016).

4.4 CONCLUSÕES

O bagaço de uva, por ser um resíduo contendo sementes, casca, engaços e restos de polpa apresenta em sua composição elevada complexidade, devido aos diferentes compostos presentes. Para mensurar a capacidade antioxidante de forma mais precisa, foi necessário aplicar diferentes metodologias nos ensaios *in vitro*, sendo que todas as amostras de bagaço de uva apresentaram capacidade antioxidante. A variedade ME apresentou elevada capacidade antioxidante com base nos métodos DPPH e auto-oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. A variedade TE se destacou pelos métodos DPPH, ABTS e auto-oxidação sistema β -caroteno/ácido linoleico. Enquanto que pelo método FRAP, apenas a variedade MI teve a maior atividade antioxidante.

Com relação aos ensaios biológicos, os extratos de todas as amostras de bagaço de uva diminuíram a formação de espécies reativas de oxigênio quando avaliados nas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Holtzman. E o efeito do potencial antioxidante do extrato da variedade ME pode ser verificado através da tendência em restabelecer os níveis de estresse oxidativo sobre os ratos com artrite induzida.

Portanto, pode-se concluir a partir dos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* que o bagaço de uva da variedade ME apresentou potencial antioxidante e pode ser reaproveitado pela indústria de alimentos e farmacêutica por ser fonte alternativa para alimentos funcionais, suplementos ou formulação de nutracêuticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho algumas considerações finais puderam ser feitas. Em termos de composição química, o bagaço de uva proveniente das variedades ME, MI e TE apresentaram elevados teores de fibras (solúveis e insolúveis). Em relação aos minerais, a variedade TE demonstrou ter resultados significativos para potássio, cálcio e ferro, enquanto que a variedade ME apresentou os maiores valores de magnésio e fósforo. Desta forma, constatou-se que os bagaços de uva podem ser considerados fontes de fibras e minerais.

Os compostos bioativos foram determinados em todas as variedades, com valores expressivos de compostos fenólicos totais e flavonoides totais para a variedade MI, e para a variedade TE, elevada quantidade de antocianinas totais.

Em termos de compostos bioativos individuais, foram encontrados os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *trans*-cinâmico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico), flavan-3-óis (catequina), flavonóis (como quercetina, rutina e caempferol) e estilbeno (resveratrol) em todas as variedades. Além disso, foram identificadas 13 diferentes antocianinas, com sinais mais intensos para malvidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-3-*O*-acetilglicosídeo e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglicosídeo.

Em relação à capacidade antioxidante dos bagaços de uva nos ensaios *in vitro*, o bagaço de uva da variedade ME apresentou elevada capacidade antioxidante com base nos métodos DPPH e auto-oxidação sistema β -caroteno/ácido linoleico, enquanto a variedade TE se destacou pelos métodos DPPH, ABTS e auto-oxidação sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Nos ensaios *in vivo*, apenas o extrato do bagaço de uva da variedade ME apresentou resultados significativos na inibição de ERO mitocondrial, mostrando que houve uma tendência em restabelecer os níveis avaliados de estresse oxidativo e o efeito antioxidante sobre os ratos com artrite induzida.

Desta forma, considerando os teores significativos dos diversos compostos bioativos encontrados no bagaço de uva e que os mesmos apresentaram resultados expressivos nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para capacidade antioxidante, pode-se concluir que estes resíduos podem ser reaproveitados pela indústria de alimentos e farmacêutica, minimizando o desperdício destes resíduos e agregando valor aos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M.H. SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.
- ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.
- AMBRIZ-PÉREZ, D. L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E. P.; HEREDIA, J. B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. **Cogent Food & Agriculture**, 2, 1131412 <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>, 2016.
- ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v.43, p.805–813, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC. International. Gaithersburg, 2000.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC. International. Gaithersburg, 2005.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC. International. Gaithersburg, 2011.
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 5 th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. G. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 9-20, p. 523-524, 2003.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, p. 475-487, 2006.
- AZIZ, M. H.; KUMAR, M. H R.; AHMAD, N. Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms (review). **International Journal of Oncology**, v. 23, p. 17–28, 2003.
- BABA, S. A.; MALIK, S. A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, p. 449–454, 2015.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

- BALDI, A.; ROMANI, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; CASETTA, B. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2104-2109, 1995.
- BAÑÓN, S.; DÍAZ, P.; RODRÍGUEZ, M.; GARRIDO, M. D.; PRICE, A. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. **Meat Science**, v. 77, p. 626-633, 2007.
- BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 – 123, 2006.
- BARRETO, G. P. M. **Carotenoides e compostos bioativos: relação com propriedades antirradical livre e corante em frutas tropicais**. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BARTON, N. J.; STEVENS, D. A.; HUGHES, J. P.; ROSSI, A. G.; CHESSEL, I. P.; REEVE, A. J.; McQUEEN, D. S. Demonstration of a novel technique to quantitatively asses inflammatory mediators and cells in rat knee joints. **Journal of Inflammation**, v. 4, n. 13, p. 1-8, 2007.
- BEHLING, E. B. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Fruits and fruit products. In: **Food Chemistry**, Berlin Heidelberg: Springer, p. 807-861, 2009.
- BELNSTEIN, J. The protective factors of fruit and vegetables. **Food Technology International**, v.10, n. 12, 2001.
- BENDELE, A. M. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 377-385, 2001.
- BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicology Pathology**, v. 27, n. 1, p. 134-42, 1999.
- BENEYTEZ, G.; CABELLO, F.; REVILLA, E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5622-9, 2003.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BIESALSKI, H. K.; DRAGSTED, L. O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.
- BLAY, S. L.; FILLENBAUM, G. G.; ANDREOLI, S. B.; GASTAL, F. L. Prevalence and concomitants of arthritis in the elderly in Rio Grande do Sul. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 9, e. 45418, 2012.
- BOLON, B.; STOLINA, M.; KING, C.; MIDDLETON, S.; GASSER, J.; ZACK, D.; FEIGE, U. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, v. 2011, p. 21, 2011.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **La Presse Medicale**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.
- BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C.A. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 91-106, 1999.
- BOZAN, B.; TOSUN, G.; ÖZCAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera*) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, p. 426-430, 2008.

BRACHT A.; ISHII-IWAMOTO E. L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA C. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (eds.), **Métodos de Laboratório em Bioquímica**, São Paulo: Manole, p. 227–248, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982.

BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M. D. Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. **Waste Management**, v. 28, p. 372-380, 2008.

CABRITA, M. J.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. **Os compostos fenólicos das uvas e dos vinhos**. I Seminário Internacional de Vitivinicultura, 2003.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. **Novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS Violeta: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005.

CAMARGO, U. A.; NACHTIGAL, J. C. Cultivares. In: NACHTIGAL, J. C.; SCHNEIDER, E. P. **Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica**. Embrapa Uva e Vinho, 2007. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc065.pdf>>. Acesso em: 18/05/2014.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S.R. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CANNON, G. W.; WOODS, M. L.; CLAYTON, F.; GRIFFITHS, M. M. Induction of arthritis in DA rats by incomplete Freund's adjuvant. **Journal of Rheumatology**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 1993.

CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 117- 124, 2003.

CAPANOGLU, E.; VOS, R. C.; HALL, R. D.; BOYACIOGLU D.; BEEKWILDER, J. Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. **Food Chemistry**, n. 139, p. 521-526, 2013.

CASTAÑEDA – OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859 – 871, 2009.

CETIN, E. S.; ALTINÖZ, D.; TARÇAN, E.; BAYDAR, N. G. Chemical composition of grape canes. **Industrial Crops and Production**, v. 34, p. 994-998, 2011.

CHACÓN, M. R.; CEPERUELO-MALLAFRÉ, V.; MAYMÓ-MASIP, E.; MATEO-SANZ, J. M.; AROLA, L.; GUITIÉRREZ, C.; VENDRELL, J. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. **Cytokine**, v. 47, p. 137–142, 2009.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.16, n.1, p.33-41, 2014.

CHENG, V. J.; BEKHIT, A. E. A.; McCONNELL, M.; MROS, S.; ZHAO, J. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. **Food Chemistry**, v. 134, p. 474-482, 2012.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005.

CLIFF, M. A.; KING, M. C. SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40, p. 92-100, 2007.

COOPER-DRIVER, G. A. Contributions of Jeffrey Harbone and co-workers to the study of anthocyanins, **Phytochemistry**, v. 56, p. 229-236, 2001.

COULTATE, P. **Alimentos, química de sus componentes: Pigmentos**. Zaragoza: Editorial Acirbia, p.104 -128, 1984.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p. 7313-7352, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução BRANDELLI, A.; RIOS, A. O.; CARVALHO, A. L. O.; OLIVEIRA, F. C.; NUNES, I.; HERTZ, P. F. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, p. 2712-2720, 2011.

DORTA, D. J.; PIGOSO, F. E.; RODRIGUES, T.; PESTANA, C. R.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1213-1218, 2008.

DOWNEY, M. O.; MAZZA, M.; KRSTIC, M. P. Development of a Stable Extract for Anthocyanins and Flavonols from Grape Skin. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 58, n. 3, p. 358-364, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUMITRIU, D.; PEINADO, R. A.; PEINADO, J.; LERMA, N. L. Grape pomace extract improves the *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 380-387, 2015.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts *in vitro* antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

FAN, E.; ZHANG, L.; JIANG, S.; BAI, Y. Review: Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 610-4, 2008.

FAOSTAT-FAO (2014). Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <www.fao.org> Acesso em: 15/02/2016.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, p. 98-111, 2001.

FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA M. R. A.; RANDAU K. P.; DE SOUZA T. P.; SOARES L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**. Article ID 923462, 2012.

FERNANDES, K. S. **Estudo da atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol por métodos analíticos e biofísicos**. Dissertação (Mestrado em Física) Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, 2011.

FERNÁNDEZ-NOVALES, J; LÓPEZ, M. I.; SÁNCHEZ, M. T.; MORALES, J.; GONZÁLEZ-CABALLERO, V. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. **Food Research International**, v. 42, p. 285–291, 2009.

FERREIRA, L. F. D. **Obtenção e caracterização de farinha de bagaço de uva e sua utilização em cereais matinais expandidos**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2010.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 229, 2009.

GALLANDER, J.; BRINER, L.; STETSON, J.; LIU, J.; KRIELOW, L.; WILKER, K.; ROMBERGER, R.; STAMP, C.; RIESEN, R. **Manual for Wine Analysis and Laboratory Techniques**, Ohio State University, OARDC, Wooster, 1987.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, p. 391-415, 2014.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4988-4994, 2009.

GIBOFSKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **American Journal of Managed Care**, v. 18, n.13, p. 295-302, 2012.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc., 2001.

GONZALEZ-CENTENO, M. R.; ROSSELLO, C.; SIMAL, S.; GARAU, M. C.; LOPEZ, F.; FEMENIA, A. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1580-1586, 2010.

GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 234-238, 2004.

GONZALO, J. C. R.; ALONSO, M. G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación, Nutrición y Salud**, v.9, n.2, p.31-38, 2002.

GUERRERO, A. T. G.; VERRY, W. A. J. R.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; ROCHA, F. A. C.; FERREIRA, S. W.; CUNHA F. Q.; PARADA, C. A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joints flexion in mice: A novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 2, p. 244-251, 2006.

HADDOUCHI, F.; CHAOUCHE, T. M.; KSOURI, R.; MEDINI, F.; SEKKAL, F. Z.; BENMANSOUR, A. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum*

stoechas subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *Saxatile*. Chinese. **Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 6, p. 0415–0422, 2014.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715S–25S, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2^a ed. Oxford University Press, 1998.

HAMINIUK, C.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; MATTOS, G.; CARPES, S. T.; BRANCO, I. G. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862-2866, 2012.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, n. 2, p. 556-559, 1978.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

HARBORNE J. B.; SIMONDS N. W. **Biochemistry phenolic compounds**. Harborne J. B. (ed.), Academic Press, 1964.

HARRIS, J. R. E. D. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: HARRIS, J. R. E. D.; BUDD, R. C.; FIRESTEIN, G. S.; GENOVESE, M. C.; SERGENT, J. S.; RUDDY S. **Rheumatology**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, p. 1043-100, 2005.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HERMES-LIMA, M. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey: Copyright, 319 - 382, 2004.

HO, C. T.; RAFI, M. M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: nutraceuticas e tóxicas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food & Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937–942, 1999.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009.

HU, F. B.; WILLETT, W. C. Optimal Diets for Prevention of Coronary Heart Disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 20, p. 2569 – 2578, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589 – 598, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, I. V. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

- ISHIMOTO, E. Y. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters**. Tese (Doutorado), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2008.
- JACKSON, R. S. **Wine science: Principles and applications**. Cap 6. p. 270-331. California: Academic Press, 2008.
- JAKOBKE, L.; SERUGA, M.; NOVAK, I.; MEDVIDOVI-KOSAN, M. Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruit. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 103. Jahrgang, Heft B, 2007.
- JAYAPRAKASH, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antimicrobial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, p. 117–122, 2003.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SING, R. P.; SAKARIAH, K. K.; Antioxidant activity of grape seed (*Vitis Vinifera*) extractions on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.
- JIN, Z.; HE, J.; BI, H.; CUI, X.; DUAN, C. Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. **Molecules**, v. 14, p. 4922–4935, 2009.
- KAMMERER, D. et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360-4367, 2004.
- KAMMERER, D. R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace - A review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 79, p. 189-196, 2005.
- KATALINIC', V.; MOZ'INA, S.; SKROZA, D.; GENERALIC', I.; ABRAMOVIC', H.; MILOS', M.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715–723, 2010.
- KENNEDY J. A.; HAYASAKA, Y.; VIDAL, S.; WATERS, E. J.; JONES, G. P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5348-5355, 2001.
- KIRKINEZOS I. G.; MORAES T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Cell & developmental biology**, v. 12, p. 449–457, 2001.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LACHMAN, S.; PETERS, R. J.; LENTJES, M. A. H.; MULLIGAN, A. A.; LUBEN, R. N.; WAREHAM, N. J.; KHAW, K. T.; BOEKHOLDT, S. M. Ideal cardiovascular health and risk of cardiovascular events in the EPIC-Norfolk prospective population study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 23, n. 9, p. 986-994, 2016.
- LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery waste. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206-1214, 2007.
- LAGO, J. H.; TOLEDO-ARRUDA, A. C.; MERNAK, M.; BARROSA, K. H.; MARTINS, M. A.; TIBÉRIO, I. F.; PRADO, C. M. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules**, v. 19, p. 3570–3595, 2014.
- LÄTTIG, J.; BÖHL, M.; FISCHER, P.; TISCHER, S.; TIETBÖHL, C.; MENSCHIKOWSKI, M.; PISABARRO, M. T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: Rationale for lead design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, p. 473–483, 2007.
- LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. Histórico da videira. In: LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M. (Ed.). **A Viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2000.
- LECAS, M.; BRILLOUET, J. M. Cell-wall composition of grape berry skins. **Phytochemistry**, v. 35, p. 1241-1243, 1994.

- LLOBERA, A.; CANELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS, F. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUQUE – RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; PÉREZ – JUAN, P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2705 – 2713, 2007.
- LUTZ, M.; CAJAS, Y.; HINRÍQUEZ, C. Phenolics content and antioxidant capacity of Chilean grapes cv. País and Cabernet Sauvignon. **Journal of Food**, v. 10, n. 4, p. 251-257, 2012.
- MAIER, T., SCHIEBER, A., KAMMERER, D.R. AND CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.
- MAISARAH, A. M.; NURUL AMIRA, B.; ASMAH, R.; FAUZIAH, O. Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 1043-1048, 2013.
- MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. R. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 125-132, 2007.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, p. 59 – 82, 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L.. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.
- MARTÍN-CARRON, N.; GONI, I.; LARRAURI, J. A.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F. Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape product in hypercholesterolemic rats. **Nutrition Research**, v. 19, n. 9, p. 1371-1381, 1999.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2010**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.
- MELLO, L. M. R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Embrapa Uva e Vinho, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>. Acesso em 20/02/2016
- MENEZES, R. R. **Monoartrite induzida por adjuvante completo de freund em ratos holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com tiamina ou riboflavina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577 – 599, 2000.
- MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6887 – 6892, 2003.

- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Food Science and Technology**, Wiltshire, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 2862-2868, 2010.
- MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.
- MONTEIRO, J.M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.
- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce, em sistemas aquoso e lipídico (CN 136). **Nutrire**, São Paulo, v.25, p.45-60, 2003.
- MORRIS, D. H.; EVANS, D. A.; BIENIAS, J. L.; TANGNEY, C. C.; BENNETT, D. A.; AGGARWAL, N.; SCHNEIDER, J.; WILSON, R. S. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 8, p. 1072, 2003.
- MORRIS, D. H. Description and Composition of Flax. In. __. **Flax – A Health and Nutrition Primer**. 4. ed, p. 9 – 21, 2007.
- MOTA L. M.; CRUZ B. A.; BRENOL C. V.; PEREIRA I. A.; FRONZA L. S.; BERTOLO M. B. Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 199-219, 2011.
- MULERO J.; PARDO F.; ZAFRILLA P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 569-574, 2010.
- MUSIALIK, M.; KUZMICZ, R.; PAWŁOWSKI, T. S.; LITWINIENKO, G. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 2699-2709, 2009.
- MURTHY, C. K. N.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5909-5914, 2002.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41-44, 2003.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NIELSEN, S. S. **Food analysis**. 3rd ed. New York: Springer, 2003.
- NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-25, 2001.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidants tannins from Rosaceae plants roots. **Food Chemistry**, v. 100, p. 579-583, 2007.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122–3128, 2002.

PANICO, A.; CARDILE, V.; AVONDO, S.; GARUFI, F.; GENTILE, B.; PUGLIA, C.; RONSISVALLE, G. The *in vitro* effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. **Phytomedicine**, v. 13, p. 522–526, 2006.

PEARSON C. M.; WOOD F. D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant. **The American Journal of Patology**, v. 42, n. 1, p. 73-95, 1963.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4557–4567, 2006.

PÉREZ – JIMENEZ, J.; SAURA – CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 579-590, 2006.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2111-2117, 2005.

POMAR, F.; NOVO, M.; MASA, A. Varietal differences among the anthocyanin profile of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1094, p. 34-41, 2005.

POSADAS, S. J.; CAZ, V.; LARGO, C.; DE LA GÁNDARA, B.; MATALLANAS, B.; REGLERO, G.; MIGUEL, E. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 44, p. 383-389, 2009.

PRIOR, R. L. ; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. **Journal of AOAC International**, v.83, n.4, p.950-956, 2000.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, 2006.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2009. Disponível em: <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>. Acesso em 01/06/13.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIN, M. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, p. 10-14, 2005.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; [...]; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. J. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'oenologie. Science et Techniques du vin**. Tome 1. Dunod, Paris, 1972.

RIZZON, L. A.; MANFROI, L. **Sistema de produção de vinhos tintos**. Embrapa, 2006.

ROBB, E. L.; PAGE, M. M.; WIENS, B. E.; STUART, J. A. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 406-412, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; DA SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897-901, 2011a.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848 - 855, 2012.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011b.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva (IN L. e *Vitis labrusca* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Edição especial, 2010.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 410-424, 2011.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203 - 210, 2007.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante "in vitro" de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. Dissertação (Mestre em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.
- SANGHA, O. Epidemiology of rheumatic diseases. **Rheumatology**, v. 39 n. 2, p. 3–12, 2000.
- SANTOS, J.; MACHADO, A. DIAS, E.; NOVAIS, A.; FERREIRA, A. **Processamento industrial do vinho tinto**. Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária, Coimbra, 2007.
- SATTAR, N.; MCCAREY, D. W.; CAPELL, H.; MCINNES, I. B. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. **Circulation**, v. 108, p. 2957–2963, 2003.
- SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant dietary fibre product: A new concept and a potential food ingredient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4303–4306, 1998.
- SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2003.
- SCHIEBER, M. T. KAMMERER, A.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.
- SENNA, E. R.; BARROS, A. L.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V. B.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004.
- SEVEN, A.; GUZEL, S.; ASLAN, M.; HAMURYUDAN, V. Lipid, protein, DNA oxidation and oxidant status in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 538–543, 2008.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SHAHID, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. Critical. **Reviews in Food Science and Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 1992.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995.
- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202–1205, 2009.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SILVA, L. M. L. R. **Caracterização dos Subprodutos da Vinificação**. Revista do ISPV, n. 28, 2003.
- SILVA, S.; MATIAS, A.; NUNES, A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 20, n. 1, p. 17-33, 2005.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, C. M. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n. 2, 2007.
- SOUSA, E. C.; UCHÔA-THOMAZ, A. M. A.; CARIOCA, J. O. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, A.; MARTINS, C. G.; ALEXANDRINO, C. D.; FERREIRA, P. A. T.; RODRIGUES, A. L. M.; RODRIGUES, S. P.; SILVA, J. N.; RODRIGUES, L. L. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.),

Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 135-142, 2014.

SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SZEKANECZ, Z.; HALLORAN, M. M.; VOLIN, M. V.; WOODS, J. M.; STRIETER, R. M.; KENNETH, HAINES, G. 3rd.; KUNKEL, S. L.; BURDICK, M. D.; KOCH, A. E. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 43, n. 6, p. 1266-1277, 2000.

TEIXEIRA, M. I. Análises físico-químicas ao vinho. Curso Técnico Profissional de Análise Laboratorial. Disponível em: < http://pt.slideshare.net/maria_ines95/prova-de-aptido-profissional-vinho>. Acesso em 15/07/2016.

TERRA, X.; MONTAGUT, G.; BUSTOS, M.; LLOPIZ, N.; ARDÈVOL, A.; BLADÉ, C.; AROLA, L. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 210–218, 2009.

THAIPONG, K., et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

TOALDO, I. M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G. C.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT - Food Science and Technology**,

TSAO, R.; YANG, Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 29 – 40, 2003.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 38 p, 1998.

VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Processing Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.

VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2008.

VINGSBO, C; SAHLSTRAND, P; BRUN, J. G.; JONSSON, R.; SAXNE, T.; HOLMDAHL, R. Pristane-induced arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. **American Journal of Pathology**, v.149. p. 1675-1683. 1996.

Von GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), a-tocopherol, BHT and BHA. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.632-638, 1997.

VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 4, p. 48–51, 1961.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3627–3652, 2005.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Food Science and Technology**, v. 16, p. 423 – 428, 2005.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2589–2599, 2005.

- XIA, E. Q.; DENG, G. F.; GUO, Y. J.; LI, H. B. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 622–646, 2010.
- XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1557–1565, 2010.
- YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332–339, 2009.
- YI, C.; SHI, J.; KRAMER, J.; XUE, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, v. 114, p. 570–576, 2009.
- YILDIRIM, H. K.; AKÇAY, Y. D.; GÜVENÇ, U.; ALTINDISLI, A.; SÖZMEN, E. Y. Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 133–142, 2005.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 255–260, 2004.
- YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; CARASSO, R. L.; MOSTOFISKY, D. I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 843 – 853, 2002.
- YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 383 – 399, 2000.
- YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, n. 2, p. 221–37, 2013.
- ZACCAGNINO, P.; SALTARELLA, M.; D'ORIA, S.; CORCELLI, A.; SAPONETTI, M. S.; LORUSSO, M. Narachidonylglycine causes ROS production and cytochrome c release in liver mitochondria. **Free Radical Biology Medicine**, v. 47, p. 585–592, 2009.

ANEXOS

ANEXO I – PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

XIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Alimentos Inovadores: desafios e oportunidades



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho



Organização



(RM09) AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO E ESPECTROSCÓPICO EM BAGAÇO DE UVA (VITIS LABRUSCA)
LEOMARA FLORIANO RIBEIRO (UFPR), ROSEMARY HOFFMANN RIBANI (UFPR), ANDRÉIA ASSUNÇÃO SOARES (UEM), CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK (UTFPR)

foi apresentado no XIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, de 14 a 16 de outubro de 2015, na UFPR campus Centro Politécnico, em Curitiba (PR).

Curitiba, 16 de outubro de 2015

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora da Comissão Científica do XIII ERSCTA

Prof. Dr. Rupércio Alvares Cançado
Presidente do XIII ERSCTA

XIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Alimentos Inovadores: desafios e oportunidades



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho



Organização



(RM08) PERFIL DE ANTOCININAS EM BAGAÇO DE UVA (VITIS VINÍFERA E VITIS LABRUSCA) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS
LEOMARA FLORIANO RIBEIRO (UFPR), ROSEMARY HOFFMANN RIBANI (UFPR), THAIS MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO (UFPR), ANDRÉIA ASSUNÇÃO SOARES(UEM), ROBERTO PONTAROLO (UFPR), CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK (UTFPR)

foi apresentado no XIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, de 14 a 16 de outubro de 2015, na UFPR campus Centro Politécnico, em Curitiba (PR).

Curitiba, 16 de outubro de 2015

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora da Comissão Científica do XIII ERSCTA

Prof. Dr. Rupércio Alvares Cançado
Presidente do XIII ERSCTA

ANEXO I – PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS



II Encontro do Programa de
Engenharia
de Alimentos
UFPR

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado

Avaliação de compostos bioativos em bagaço de uva (*Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*) por métodos espectrofotométrico, cromatográfico e espectroscópico

de autoria de

***Leomara Floriano RIBEIRO; Rosemary Hoffmann RIBANI; Andréia Assunção SOARES;
Charles Windson Isidoro HAMINIUK***

foi apresentado no formato de pôster durante o
II Encontro do Programa de Engenharia de Alimentos
da Universidade Federal do Paraná no dia 27 de novembro de 2015,
em Curitiba, PR, conforme programa do evento em anexo.

Realização



PPGEAL UFPR
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UFPR
100
Anos
DESDE 1912



Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani
Coordenadora do PPGEAL/UFPR

www.posalim.ufpr.br

ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO

Journal of Chromatography B, 1007 (2015) 72–80



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses



L.F. Ribeiro^{a,b,*}, R.H. Ribani^a, T.M.G. Francisco^d, A.A. Soares^e, R. Pontarolo^d, C.W.I. Haminiuk^c

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná 81531-980, Brazil

^b Universidade Federal do Paraná Campus Avançado em Jandaia do Sul, Jandaia do Sul, Paraná 86900-000, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, Paraná 87301-899, Brazil

^d Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná 80210-170, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná 87020-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2015

Received in revised form 27 October 2015

Accepted 3 November 2015

Available online 11 November 2015

Keywords:

Phenolic compounds

Anthocyanins

Flavonoids

Fatty acids

Infrared reflectance

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize grape pomace (GP) from winemaking byproducts of different grape samples (Cabernet Sauvignon—CS; Merlot—ME; Mix composed of 65% Bordeaux, 25% Isabel and 10% BRS Violet—MI and Terci—TE) with a view to exploiting its potential as a source of bioactive compounds and an alternative to the reuse of waste. Bioactive compounds such as individual phenolic compounds and polyunsaturated fatty acids (PUFA) were identified and quantified by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. The sample of MI had the highest concentrations for total phenolic compounds and total flavonoids, while TE had the highest content for total monomeric anthocyanins. For all samples it was possible to identify 13 different anthocyanins by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). Moreover, the GP samples showed phenolic acids; flavan-3-ols such as catechin; flavonols such as quercetin, rutin and kaempferol; and stilbenes such as *trans*-resveratrol. Therefore, grape pomace can be considered a source for the recovery of phenolic compounds having antioxidant activity as well as a rich source of PUFA. Thus it can be used as an ingredient in the development of new food products, since it is suitable for human consumption, and a viable alternative both to adding nutritional value to food and to reduce environmental contamination.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Bioactive compounds are compounds that occur in nature, are part of the food chain and typically occur in small amounts in foods but have an effect on human health due to their possible influence on physiological and cellular activities [1]. Most common bioactive compounds include secondary metabolites such as antibiotics, alkaloids, pigments, plant growth factors, phenolic compounds present in all fruits and essential fatty acids.

Phenolic compounds can be divided into two groups: non-flavonoid (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and stilbenes) and flavonoid compounds (anthocyanins, flavonols, free or polymerized flavan-3-ols and tannins). While the fatty acids can be

saturated (no double bond), monounsaturated (one double bond) or polyunsaturated (two or more double bonds). The major polyunsaturated fatty acids are linoleic and alpha-linolenic acids, which are considered essential fatty acids because they are important for energetic, metabolic, and structural activities [2,3]. In recent years, great attention has been given to ingestion of foods rich in bioactive compounds due to their ability to promote human health benefits and reduce the risk of developing certain conditions such as cancer, diabetes, neurodegenerative, inflammatory and cardiovascular diseases, and their antimicrobial and anti-carcinogenic effects attributed mainly due to its antioxidant and anti-radical activity [4].

Grape is one of the fruits that have significant concentrations of bioactive compounds. Besides that, it is one of the most grown fruit crops in the world with an annual production of more than 54 million tons [5]. The benefits of grapes intake are associated with phenolic compounds due to their high antioxidant potential and polyunsaturated fatty acids (PUFA), mainly essential fatty

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná 81531-980, Brazil.

E-mail addresses: leomara.ribeiro@ufpr.br, leoivp9@yahoo.com.br (L.F. Ribeiro).